

**Caractérisation de l'ARN de la télomérase chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

Par

Nancy Lévesque

Département de microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Science de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Novembre 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-26017-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-26017-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

I. Table des matières.....	I
II. Liste des illustrations.....	III
III. Liste des abréviations.....	VI
IV. Résumé.....	
V.Introduction.....	1
1. Les télomères.....	3
1.1 Organisation structurale des télomères.....	4
1.2 Protéines associées aux télomères.....	7
2. La télomérase.....	14
2.1 Les composantes protéiques de la télomérase.....	16
2.2 La composante ARN de la télomérase.....	21
2.3 Les mécanismes de régulation de la télomérase.....	27
Chapitre I. Détermination de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	
Préambule.....	31
Objectif spécifique.....	32
Matériel et méthodes.....	33
Résultats.....	40
Chapitre II. Criblage de mutants sensibles au froid	
Préambule.....	49

Objectif spécifique.....	51
Matériel et méthodes.....	52
Résultats.....	58
Chapitre III. Purification de la télomérase chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	
Préambule.....	65
Objectif spécifique.....	67
Matériel et méthodes.....	68
Résultats.....	74
VI. Discussion et conclusions.....	84
VII. Remerciements.....	97
VIII. Liste des références.....	98
IX. Annexe.....	124
Autorisation des co-auteurs.....	125 ^a 125 ^b
Manuscrit édité.....	126

II. Liste des illustrations

Figure 1.	Le problème réplcatif terminal.....	2
Figure 2.	Modèle de conformation des télomères chez la levure.....	6
Figure 3.	Modèle de conformation des télomères chez l'humain.....	9
Figure 4.	Cycle d'élongation de la télomérase.....	16
Figure 5.	Domaines fonctionnels de la sous-unité catalytique Est2..	17
Figure 6.	Composantes de la télomérase du cilié <i>T. thermophila</i>	20
Figure 7.	Modèles de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase des ciliés et vertébrés.....	22
Figure 8.	Formation pseudonoeud retrouvé chez l'humain.....	23
Figure 9.	Expression des différents ARNs homologues à TLC1 des souches des « sensu stricto ».....	41
Figure 10.	Contrôles de complémentation des homologues de TLC1 dans la souche <i>S. cerevisiae</i> S288C.....	42
Figure 11.	Longueur des TRFs des souches complémentées par les homologues de TLC1 dans une souche <i>S. cerevisiae</i> S288C.....	44
Figure 12.	Détermination des extrémités 5' des ARNs chez les souches « sensu stricto ».....	46
Figure 13.	Extrémités 5' des ARNs chez les souches « sensu stricto ».....	46
Figure 14.	Modèle proposé pour la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	48
Figure 15.	Schéma du criblage des mutants sensibles au froid.....	57

Figure 16.	<i>Fragments d'ADN amplifiés lors de la deuxième ronde de PCR (sans dITP).....</i>	<i>59</i>
Figure 17.	<i>Résultats des rondes d'amplification par PCR.....</i>	<i>60</i>
Figure 18.	<i>Isolation de mutants sensibles au froid.....</i>	<i>61</i>
Figure 19.	<i>Longueur des TRFs des souches complémentées par les mutants sensibles au froid.....</i>	<i>63</i>
Figure 20.	<i>Mutations des clones sensibles au froid.....</i>	<i>64</i>
Figure 21.	<i>Schéma de la méthode de purification.....</i>	<i>66</i>
Figure 22.	<i>Schéma de l'insertion du tag ARN S1 à l'ARN de TLC1.....</i>	<i>69</i>
Figure 23.	<i>Analyse de la qualité de l'ARN extrait.....</i>	<i>76</i>
Figure 24.	<i>Dilutions de la réaction de la transcription inverse.....</i>	<i>77</i>
Figure 25.	<i>Analyse de la capacité de liaison de l'apatamère S1 aux billes en présence d'extrait cellulaire.....</i>	<i>79</i>
Figure 26.	<i>Analyse de la présence de l'ARN RPR1-S1 à chaque étape de purification.....</i>	<i>81</i>
Figure 27.	<i>Analyse de la présence de l'ARN TLC1-S1 à chaque étape de purification.....</i>	<i>82</i>
Figure 28.	<i>Schéma récapitulatif de la taille des TRFs vs la distance évolutive.....</i>	<i>86</i>
Figure 29.	<i>Modèle des structures secondaires des ARN de la télomérase des ciliés, vertébrés et Saccharomyces.....</i>	<i>87</i>
Tableau 1.	<i>Comparaison de la nature des répétitions télomériques chez différents organismes.....</i>	<i>4</i>
Tableau 2.	<i>OLigonucléotides utilisés pour les extensions d'amorces afin de déterminer l'extrémité 5' des ARNs des souches des « sensu stricto ».....</i>	<i>37</i>

Tableau 3.	<i>Complémentation des homologues de TLC1 dans la souche <i>S. cerevisiae</i> S288C.....</i>	<i>43</i>
Tableau 4.	<i>Fréquences de mutations à l'ADN avec différentes méthodes de mutagenèse.....</i>	<i>58</i>
Tableau 5.	<i>Amorces et sondes utilisées pour le PCR en temps réel.....</i>	<i>72</i>
Tableau 6.	<i>Analyse de la capacité des billes à lier le tag ARN S1.....</i>	<i>78</i>

III. Liste des abréviations

5-FOA	acide 5-fluorootique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal
ARN	acide ribonucléique
ARS	séquences de réplication autonome
ATP	adénosine-5'-triphosphate
BSA	sérum d'albumine bovine
°C	degré elsius
CR	région conservée
dNTP	désoxyribonucléotide : dATP (désoxi adénine triphosphate), dCTP (désoxy cytosine triphosphate), dGTP (désoxy guanine triphosphate), dTTP (désoxy thymine triphosphate)
D-loop	boucle de déplacement
D.O.	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène-diamine-tétracétique
Denhardt's	solution mere 50X (volume final 200 mL, 2 g BSA, 2 g Ficoll, 2 g PVP (polyvinylpyrrolidone))
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMS	diméthyl sulfoxide
EST	(ever shorter telomere) télomeres raccourcissant progressivement
G	générations

Kb	kilobase
kDa	kilodalton
kpb	kilopaire de base
LB	milieu « Luria Broth » (0,5% Yeast Extract, 1% Tryptone, 1% NaCl)
LEU	leucine
ME	microscopie électronique
µg	microgramme
µL	microlitre
mg	milligramme
min	min
mL	millilitre
mM	milimolaire
NHEJ	(non-homologous –end –joining) raboutage de l'ADN sans besoin d'homologie
nm	nanomètre
nt	nucléotide
OB fold	repliement du site de liaison des oligonucléotides et oligosaccharides
pb	paires de bases
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
pH	mesure de l'acidité
pmol	pocimol
RNP	ribonucléoprotéine
rpm	révolution par minute

RT	transcriptase inverse
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	solution mère (3,0 M NaCl, 0,3 M Na-citrate)
snoRNA	ARN nucléolaire de petite taille
snRNP	RNP nucléaire de petite taille
T4 PNK	T4 Polynuclease kinase
TAS	séquences associées aux télomères
TERT	transcriptase inverse de la télomérase
<i>TLC1</i>	gène de l'ARN de la télomérase chez <i>S. cerevisiae</i>
TLC1	composante ARN de la télomérase chez <i>S. cerevisiae</i>
T-loop	boucle-télomérique
TMG	triméthylguanosine
TPE	effet de proximité télomérique (telomere position effect)
TR	ARN de la télomérase
TRF	fragment terminal de restriction (terminal restriction fragment)
Tris-HCl	chlorhydrate (hydroxyméthylque) d'aminomethane de Tris
TRP	tryptophane
URA	uracile
V	volt
YC	milieu synthétique complet de culture de levure

Caractérisation de l'ARN de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Nancy Lévesque

Département de microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Science de la
santé en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Novembre 2006

IV. Résumé

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques servant au maintien de l'intégrité des chromosomes. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, des répétitions télomériques $TG_{1-3}/C_{1-3}A$, se succèdent pour former un segment d'une longueur d'environ 300 pb. Le maintien de ces séquences répétées indispensables pour la stabilité du génome se fait par une enzyme appelée la télomérase. Cet enzyme est constitué de plusieurs sous-unités protéiques ainsi que d'une composante ARN servant de matrice pour l'addition des répétitions et d'échafaudage pour l'assemblage du RNP. La structure secondaire de l'ARN de la télomérase des ciliés et vertébrés a déjà été déterminé par analyse phylogénétique. Par contre, chez la levure, seulement de petits éléments structuraux ont été identifiés. La difficulté dans la détermination de la structure réside dans le fait que la bassin de population des ARNs pouvant être utilisés pour l'analyse est très

faible et que l'ARN de la levure est d'une taille considérable (1 200 nt) comparativement aux ciliés (150 nt) et aux vertébrés (450 nt).

Dans une première étude, nous avons élaboré un modèle de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase TLC1. En premier lieu il fallait trouver des souches qui avaient une distance évolutive appropriée par rapport à *S. cerevisiae*. Donc, les ARNs homologues de TLC1 provenant des souches « sensu stricto », ont été isolés et caractérisés par Northern blot. Puis, ils ont remplacés l'ARN TLC1 dans les souches de levure *S. cerevisiae* afin de déterminer la structure/fonction de ses ARNs. Par ailleurs, afin de faciliter l'alignement des ARNs nécessaire à l'analyse phylogénétique, la détermination de l'extrémité 5' a été effectuée comme point d'ancrage pour l'alignement. L'analyse phylogénétique nous a permis de suggérer un modèle de la structure de l'ARN TLC1 qui nous permettra de faciliter l'étude de la fonction et du mode d'assemblage de l'holoenzyme.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu poursuivre l'étude de la caractérisation de la structure secondaire mais aussi tertiaire de l'ARN de la télomérase. Un criblage de mutants sensibles au froid a été mis au point afin de d'identifier les interactions critiques de l'ARN TLC1. Ce criblage est basé sur le principe certains changements spécifiques dans une molécule d'ARN peuvent provoquer une stabilisation d'interactions inappropriées qui à 18°C provoquera la mort des cellules, mais qui permettra toujours aux cellules de survivre à 30°C. Lors de cette étude, 10 mutants sensibles au

froid ont été isolés sur 20 000 clones criblés. Les mutations introduites dans ces clones pourraient nous aider à améliorer notre compréhension du fonctionnement de l'enzyme.

Finalement, la détermination d'un modèle de la structure secondaire de l'ARN de *TLC1* a révélée de nouveaux sites potentiels de liaison de facteurs impliqués dans la structure/fonction de l'ARN. Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode de purification de la télomérase qui utilise l'ARN comme appât. Cette technique qui avait déjà fait ses preuves pour un autre ARN, s'est avérée moins efficace qu'on le désirait pour l'ARN de *TLC1*. En effet, le taux d'enrichissement de *TLC1* lors de la purification est trop faible pour parvenir à identifier de nouveaux partenaires.

V. Introduction

Toutes les cellules qui se divisent doivent bien évidemment répliquer leurs chromosomes de façon à assurer la survie de leur progéniture. Par ailleurs, les ADN polymérases conventionnelles ont la capacité de synthétiser l'ADN seulement de 5' vers 3' et ont besoin d'amorces d'ARN. Pour les organismes qui possèdent des chromosomes linéaires, cela peut entraîner des complications lors de la réplication de l'extrémité des chromosomes (Figure 1). La majeure partie du problème se retrouve au niveau de la synthèse du brin avancé. Le brin avancé est synthétisé de façon continue. Par contre, étant donné que l'extrémité 5' du brin parental est plus en retrait par rapport à l'extrémité de 3' du brin opposé. Le brin avancé nouvellement synthétisé sera alors plus court que le brin parental. En effet, on assistera à une perte de quelques nucléotides. D'un autre côté, le brin retardé est copié de façon discontinue grâce aux fragments d'Okazaki. La dégradation des amorces d'ARN utilisés pour la synthèse laisse des espaces qui seront comblés par extensions et ligations. Encore une fois, il y aura un déficit de 8 à 12 nt à l'extrémité du brin 5' nouvellement synthétisé. Cette défaillance au niveau de la réplication des extrémités des chromosomes peut mener à la perte de 4 à 6 pb par division chez la levure et de 50 à 150 pb chez certains mammifères (Blasco et al., 1997; Harley et al., 1990; Lundblad et Szostak, 1989 ; Niida et al., 1998). Ce phénomène ne cause aucun problème pour certaines cellules somatiques dont le nombre de divisions cellulaires doit être contrôlé (Wright et al., 1992;

Wright et Shay, 1992). Par contre, ceci peut être perçu comme un inconvénient pour les cellules dont le maintien de l'intégrité des chromosomes est crucial, telles les cellules germinales et embryonnaires. C'est pourquoi les cellules se sont pourvues d'un mécanisme pour le maintien des extrémités des chromosomes : la télomérase. Cette enzyme permet d'allonger les extrémités des chromosomes, les télomères, que la machinerie de réplication conventionnelle n'est pas en mesure d'effectuer.

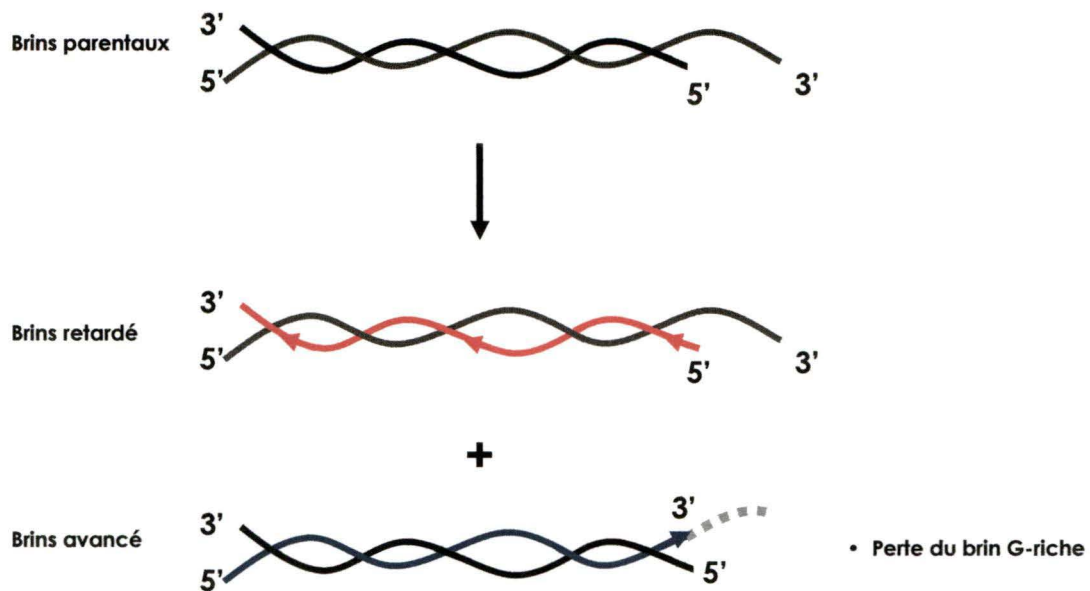


Figure 1. Le problème réplcatif terminal. Lors de la réplication des brins parentaux, le brins avancé n'est pas en mesure d'être reproduit de la même façon que le brin mère. En effet, la réplication conventionnelle n'est pas en mesure de reproduire l'extension simple brin en 3'. Alors à chaque division cellulaire l'extrémité des chromosomes va raccourcir, à moins que la cellule adopte un mécanisme alternatif qui lui permette de maintenir la longueur de ses extrémités.

1. Les télomères

Chez les eucaryotes, les chromosomes ont une structure linéaire. Afin d'éviter que leurs extrémités soient perçues comme des cassures double brins, la cellule a développé une structure bien particulière à la fin des chromosomes. Cette structure est composée d'ADN et de plusieurs protéines qui forment un complexe appelé télomère.

La découverte de l'existence des télomère (provenant des mots grecs telos et meros pour "fin" et "partie") a été réalisée grâce à des travaux indépendants. En effet, le généticien Hermann J. Muller observa que l'irradiation aux rayons X des mouches à fruit *Drosophila melanogaster* provoquaient des réarrangements chromosomiques, excepté au niveau des extrémités. C'est à ce moment qu'il a commencé à soupçonner que celles-ci devaient avoir une structure distinctive (Muller, 1938). Par ailleurs, l'existence de propriétés particulières des fins des chromosomes a été aussi démontrée par Barbara McClintock qui étudiait l'évolution des chromosomes cassés chez *Zea Mays*. McClintock démontrait que les extrémités naturelles des chromosomes étaient incapable de fusionner entre elles, tandis que les chromosomes brisés étaient en mesure de fusionner les uns avec les autres (McClintock, 1939).

1.1 Organisation structurale des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques, donc constitués d'ADN et de diverses protéines. Les premières séquences télomériques à avoir été isolées sont celles du protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila*. Les résultats de séquençage démontrent des répétitions particulières (C_4A_2/T_2G_4) mais de longueur très variable (120 à 420 pbs) (Larson et al., 1987). Par la suite, la caractérisation des télomères s'est poursuivie chez plusieurs autres organismes tels les levures, les vertébrés, certaines plantes et bien sur les mammifères (Tableau 1). Dans la majorité des cas, les séquences répétitives sont régulières. Par exemple, chez les vertébrés les télomères sont composés d'une séquence consensus T_2AG_3 . Par contre, chez d'autres organismes,

Organismes	Séquences	Références
Ciliés		
<i>Tetrahymena</i>	T_2G_4	(Blackburn et Gall, 1978)
<i>Oxytricha</i>	T_4G_4	(Klobutcher et al, 1981)
<i>Euplotes</i>	T_4G_4	(Klobutcher et al, 1981)
Champignons		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$T(G)_{2-3}(TG)_{1-6}$	(Shampay et al., 1984)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$T_2AC(A)G_{4-5}$	(Sugawara et Szostak, 1986)
<i>Candida albicans</i>	ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT	(McEachern et Hicks, 1983)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGATTGATTAGGTATGTGGTGT	(McEachern et Blackburn, 1994)
Plantes		
<i>Arabidopsis</i>	T_3AG_3	(Richards et Ausubel, 1988)
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	T_2AG_3	(Moyzis et al., 1988)
<i>Mus musculus</i>	T_2AG_3	(Kipling et Cooke, 1990)

Tableau 1. Comparaison de la nature des répétitions télomériques chez différents organismes.

comme la levure *S. cerevisiae*, les répétitions sont plutôt dégénératives ($(T(G)_1)_3T(G_{1-6})$). La longueur de ces séquences répétées varie aussi d'un organisme à l'autre. On retrouve en moyenne chez les vertébrés des séquences pouvant atteindre quelques milliers de paires de bases, tandis que chez la levure, elles se situent plutôt autour de 300 pb. On observe également une extension G riche en 3' chez la plupart des organismes. Chez l'humain elle peut aller de 100 à 200 nt mais chez la levure cette extension est d'environ 12-14 nt en dehors de la phase S et peut atteindre 30 nt en fin de phase S (Larrivee et al., 2004; McElligott et Wellinger, 1997; Wellinger et al., 1993; Wright et al., 1997).

Certains organismes ne possèdent pas de séquences répétées à l'extrémité de leurs chromosomes. Chez les diptères tels la mouche à fruit *D. melanogaster*, un système de rétrotransposons est utilisé pour maintenir la longueur des télomères (Biessmann et al., 1997). En effet, les éléments transposables HeT-A et TART s'insèrent à la fin des chromosomes pour former des télomères. Par ailleurs, chez *Chironomous*, le maintien de l'extrémité des chromosomes se fait par recombinaison de séquences préexistantes (Nielsen et Edstrom, 1993).

Chez la plupart des organismes, on retrouve des régions sous-télomériques (TAS: Telomere Associated Sequences) en amont des répétitions télomériques terminales. Chez l'humain, on observe des répétitions dégénératives qui délimitent des bouts de séquences homologues

non-télomériques. Par contre, chez la levure, ces régions sont composées de deux éléments principaux : les éléments Y' et X (Figure 2) (Chan et Tye, 1983). L'élément Y', hautement conservé, peut être présent jusqu'à quatre copies en tandem par télomère. Ces fragments retrouvés sur les deux tiers des télomères possèdent une taille de 5,2 kpb (Y' court) et 6,7 kpb (Y' long). À l'opposé, le noyau X est beaucoup moins conservé et est d'une taille inférieure pouvant aller de 0,3 kpb à 3,7 kpb. Ces séquences se retrouvent sur la plupart des télomères jusqu'à 5 copies et contiennent le site de liaison pour la protéine Abf1p (Brand et al., 1987). Des séquences télomériques dégénératives peuvent se retrouver entre les répétitions en tandem de l'élément Y' ainsi qu'entre l'élément Y' et X. Par ailleurs, un ARS (Autonomous Replicating Sequence) est présent dans les éléments Y', présentant une activité en fin de phase S (Reynolds et al., 1989).

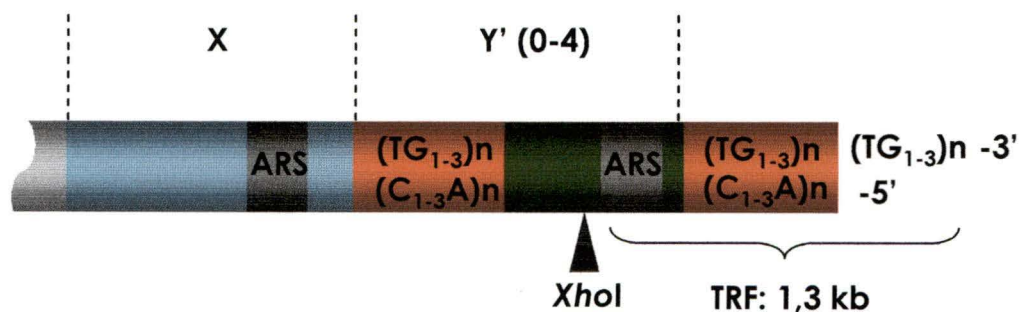


Figure 2. Organisation structurale des télomères chez *S. cerevisiae*. À l'extrémité des chromosomes se retrouvent des séquences répétitives, dont une extension G-riche en 3'. En amont de l'extrémité, des éléments Y' prennent place entre 0 et 4 copies. Cet élément contient un site de restriction pour XhoI utilisé pour libérer un fragment terminal de restriction (TRF) d'une longueur d'environ 1,3 kb. Disjoint aux élément Y', est localisé le core X. Chacun de ces éléments contiennent des ARS.

Néanmoins, le rôle des TAS reste nébuleux. En effet, certains chromosomes dépourvus de TAS ne semblent avoir aucun problème de réplication (Wellinger et Zakian, 1989; Zakian et Blanton, 1988). Par contre, il a été démontré que les éléments Y' ont la capacité de se propager par recombinaison homologue (Dunn et al., 1984; Horowitz et Haber, 1985; Louis et Haber, 1990). En effet, il a été observé que les TAS chez certains organismes pouvaient servir de mécanisme alternatif afin de maintenir une fonctionnalité des télomères par recombinaison ou transposition lorsque la télomérase est absente (Biessmann et Mason, 1992; Blackburn et Gall, 1978; Levis et al., 1993; Lundblad et Blackburn, 1993; Pardue et al., 1996).

1.2 Les protéines associées aux télomères

Les télomères occupent différentes fonctions au sein de la cellule. Ces diverses fonctions sont entre autre attribuées aux multiples protéines associées aux télomères. Celles-ci sont essentiellement impliquées dans la protection des extrémités chromosomiques. Les cassures double brin, contrairement aux télomères, sont susceptibles à la dégradation par des exonucléases ainsi qu'aux fusions entre les extrémités libres. Les télomères, quant à eux, préviennent la formation de chromosomes dicentriques et la perte d'information génétiques lors de la réplication (Smogorzewska et de Lange, 2004). Les télomères occupent aussi une fonction dans la localisation

nucléaire des chromosomes et lors de la ségrégation lors de la méïose (Chikashige et al., 1994).

Afin d'assurer sa fonction de protection de l'intégrité des chromosomes, l'ADN télomérique adopte une structure bien particulière grâce à la présence de plusieurs autres protéines (Wright et Shay, 1992). Cette conformation, retrouvée chez plusieurs organismes, est composée de chromatine protégeant les extrémités des diverses nucléases.

Le capuchon télomérique chez l'humain est constitué principalement des protéines TRF1 et 2 (TTAGGG Repeat-binding Factor 1 et 2) qui lient la région double-brin des télomères. Chez la levure *S. cerevisiae*, l'homologue fonctionnel Rap1p (Conrad et al., 1990) (Taz1p chez *S. pombe*) (Cooper et al., 1997) occupe la même fonction.

TRF1 et TRF2 sont structurellement homologues et ont tous les deux la capacité de reconnaître des séquences double-brins spécifiques (T_2AG_3/C_3TA_2) grâce à un domaine de type Myb (Ancelin et al., 1998) tandis qu'un autre domaine leur permettent de former des homodimères (Bianchi et al., 1997). À cause de son rôle de régulateur négatif de la longueur des télomères, on associe TRF1 comme étant l'homologue de Rap1p chez la levure (Ancelin et al., 2002).

TRF2, tel que mentionné plus haut, est très similaire à TRF1. En effet, il a la capacité de lier les duplexe d'ADN télomérique en plus de se localiser à l'extrémités des chromosomes en métaphase (Smogorzewska et al., 2000). La surexpression d'une forme tronquée de TRF2 pour son domaine de liaison à l'ADN et de sa partie en N-terminale, engendre une perte de l'extension G-riche en 3' et une augmentation des fusions des extrémités des chromosomes (van Steensel et al., 1998). Ce mutant de TRF2 prévient aussi la formation de la structure T-loop observée en microscopie électronique (ME) (Griffith et al., 1999). Par ailleurs, le télosome adopte une structure en T-loop (Telomere loop) qui serait en fait un envahissement du brin G-riche à une région double-brin homologue qui occasionnerait une conformation en forme de boucle (Figure 3). TRF1 occuperait un rôle majeur dans le repliement de cette structure. Par ailleurs, TRF2 remplirait une fonction importante quant à

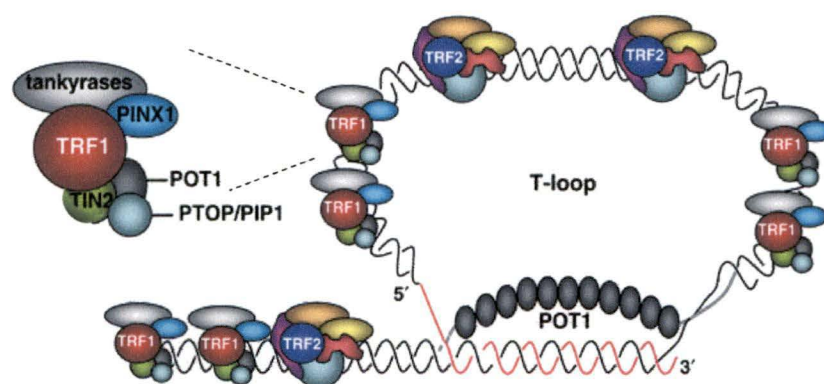


Figure 3. Modèle de conformation des télomères chez l'humain. Les longues extrémités des chromosomes chez l'humain se replient de façon à former une structure en boucle (T-loop). TRF1 ainsi que TRF2 sont responsables de cette conformation. Adapté de (Blasco, 2005)

l'invasion du simple-brin et de l'appariement avec un duplexe homologue formant le D-loop (Displacement loop). D'autre part, TRF1 a la capacité de se lier à plusieurs autres protéines. Il a été démontré que PINX1 (Pin2-Interacting Protein X1), qui interagit avec TRF1 ainsi que TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), provoque l'inhibition de l'activité télomérase *in vitro* suggérant que PINX1 affecte la longueur des télomères en régulant la télomérase via le nucléole (Zhou et Lu, 2001). TRF1 lie également TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear Protein 2) qui protège TRF1 d'éventuelles modifications par Tankyrase 1 et stabilise l'interaction de ces trois éléments (Ye et de Lange, 2004). Tankyrase 1 et 2 (Smith et al., 1998) ainsi que l'hétérodimère Ku (Hsu et al., 2000) s'adjoignent à TRF1 afin de réguler l'accès aux télomères. TIN2 s'associe à PTPN1 (PIP1) qui interagit avec POT1 recruté au niveau des télomères. Récemment, deux formes de POT1 ont été répertoriées chez la souris (Hockemeyer et al., 2006; Wu et al., 2006). Cependant, la délétion de chacune des protéines génère des phénotypes différents. Une délétion de POT1A provoque la létalité embryonnaire prématurée tandis qu'une délétion de POT1B donne des souris vivantes et fertiles (Discuté dans (Baumann, 2006)). POT1 possède un domaine OB-fold (Oligonucleotide and oligosaccharide-binding fold) déterminant pour sa liaison à l'ADN simple-brin G-riche (Baumann et Cech, 2001; Horvath et al., 1998; Mitton-Fry et al., 2002). Il contient également un autre domaine permettant de lier TRF1 (Loayza et De Lange, 2003). La surexpression d'un mutant POT1 dépourvu de son domaine OB, entraîne une rapide élongation

des télomères (Loayza et de Lange, 2003), suggérant que POT1, via TRF1, inhibe l'accès de la télomérase aux télomères. Par ailleurs, des expériences ont démontré que POT1_{OB} est tout de même localisé aux télomères, mais grâce à l'interaction de d'autres protéines (Loayza et de Lange, 2003). À l'opposé, la surexpression de POT1 provoque un allongement des télomères, proposant POT1 comme étant un régulateur positif de la télomérase (Colgin et al., 2003).

Chez la levure *S. cerevisiae*, Rap1p (Repressor Activator Protein 1) a une implication majeure dans la régulation de la longueur des télomères. Rap1p, comme TRF1, possède deux domaines de type Myb lui permettant de se lier à l'ADN double-brin (Conrad et al., 1990; Gilson et al., 1993; König et al., 1996; Wright et Zakian, 1995). La protéine Rap1p est en réalité un régulateur négatif de la télomérase grâce à l'interaction les protéines Rif1p et Rif2p en sa partie C-terminale dont la délétion provoque l'élongation des télomères (Kyrion et al., 1992; Sussel et Shore, 1991). Rap1p empêcherait d'ailleurs la fusion des télomères qui se produiraient par NHEJ lors de sa délétion (Pardo et Marcand, 2005). Par ailleurs, Rap1p fait partie intégrante de la formation hypothétique d'une structure en boucle à l'extrémité des chromosomes. Contrairement aux humains, la formation en boucle impliquerait les régions sous-télomériques des chromosomes et serait moins déterminante pour l'intégrité des extrémités. En fait, il a été démontré que la perte de la structure n'entraîne en rien la perte de chromosomes indiquant

que cette structure en boucle est dispensable pour la stabilité génomique (de Bruin et al., 2000).

La partie C-terminale de Rap1p sert également à la liaison avec les protéines Sir3 et Sir4 étant responsable du TPE (Telomere Position Effect). Le TPE est la répression de l'expression des gènes adjacents au télomères chez la levure. Sir2p est une désacétylase qui occupe un rôle dans la répression de la transcription dans les régions sous-télomériques par l'intermédiaire de Sir3p et Sir4p et qui désacétyle les queues N-terminales des histones H3 et H4 (Suka et al., 2002). Sir2p est également impliqué dans la répression transcriptionnel aux loci *HML/HMR* ainsi qu'au niveau des répétitions d'ADN ribosomal. Le TPE est pratiquement aboli lors de l'absence des certains gènes non-essentiels tels SIR2, SIR3, SIR4, YKU70, YKU80 ou soit lors de la délétion de la partie C-terminale de Rap1p (Mishra et Shore, 1999).

Cdc13p (Cell Division Cycle) a la capacité de se lier à l'ADN simple brin télomérique (TG₁₋₃) (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996). Cette protéine a d'abord été caractérisée comme étant essentielle à la progression du cycle cellulaire (Hartwell, 1974), mais son analyse a pu être poussée grâce à la mutation *cdc13-1*. On observe chez des cellules contenant cette mutation une croissance accrue du nombre de réarrangements dans les régions sous-télomériques ainsi qu'une dégradation du brin C-riche donnant des extensions

G-riche simple-brin en 3' qui sont en mesure d'activer un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Garvik et al., 1995). Cdc13p a aussi la possibilité de s'associer à Est1p, afin de recruter la télomérase aux télomères, ainsi que d'interagir avec Stn1p et Ten1p afin d'assurer la protection des fins chromosomiques. Stn1p (Suppressor of cdc Thirteen 1) et Ten1p (Protein involved in Telomeric pathways in association with Stn, number 1) interagissant avec Cdc13p, occupent un rôle majeur dans la prévention de la dégradation des télomères (Grandin et al., 2001a; Grandin et al., 1997; Pennock et al., 2001).

L'hétérodimère Ku est un autre complexe associé aux télomères mais aussi à toutes les extrémités d'ADN double-brin, telles les cassures double-brin. Ce complexe, formé d'une sous-unité de 70 et 80 kDa chez la levure, a un rôle prépondérant dans la réparation des bris d'ADN via le NHEJ (Non-Homologous End Joining) et aussi au niveau du recrutement de la télomérase aux télomères (Peterson et al., 2001). En effet, l'ARN de la télomérase possède un site de liaison pour l'hétérodimère Yku. La délétion de la tige boucle lié par YKu dans l'ARN de *TLC1*, provoque un raccourcissement des télomères (Peterson et al., 2001). Les allèles dépourvus de YKu (*YkuΔ*), présentent aussi une diminution de la longueur des télomères et de plus, la présence d'extensions G-riche en 3' tout au long du cycle cellulaire (Gravel et al., 1998; Polotnianska et al., 1998; Porter et al., 1996). Yku contribue à un phénomène de répression transcriptionnelle des gènes de la régions sous-

télomérique (TPE), qui est largement diminué chez les cellules mutantes pour ce complexe (Gravel et al., 1998; Laroche et al., 1998; Nugent et al., 1998).

2. La télomérase

La télomérase a tout d'abord été découverte chez l'organisme *Tetrahymena thermophila* par voie biochimique (Greider et Blackburn, 1985). Chez l'humain, la télomérase ajoute des répétitions au niveau du brin G-riche en 3'. Cette enzyme est constituée de plusieurs protéines ainsi que d'une composante ARN. Certaines expériences ont démontré que cet ARN servait de matrice pour l'addition de répétitions télomériques (Greider et Blackburn, 1987, 1989). La télomérase présente une activité soutenue au niveau des cellules germinales mais très limitée chez les cellules somatiques (Blackburn et al., 1992). De plus, l'activité de la télomérase est dépendante de la sous-unité catalytique hTERT (Telomerase Reverse Transcriptase) (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997) dont la fonction peut être régulée de diverses façons. Chez les organismes unicellulaires, la télomérase est active de façon constitutive et maintient la longueur des télomères. Dans le cas de la levure, les sous-unités de la télomérase ont été découvertes grâce à un criblage génétique basé sur l'incapacité des cellules ayant perdu la télomérase à maintenir l'intégrité d'un chromosome artificiel. Donc, des mutants défaillant au niveau de l'activité télomérase ainsi que de la réplication des télomères ont été répertoriés menant à l'identification des gènes EST1,

EST2, EST3 et EST4/CDC13 (EST: Ever Shorter Telomeres) (Lendvay et al., 1996; Lingner et al., 1997; Lundblad et Szostak, 1989). Un autre élément essentiel du complexe a été découvert lors d'un criblage visant les gènes qui avaient la capacité de supprimer le silençage transcriptionnel, la composante ARN : TLC1 (Telomerase Component 1) (Singer et Gottschling, 1994). Malgré le fait que la présence de tous les gènes *ESTs* ainsi que l'ARN de la télomérase soit fondamentale *in vivo* (Singer et Gottschling, 1994), uniquement les composantes *EST2* et *TLC1* sont essentielles pour une activité *in vitro* (Cohn et Blackburn, 1995; Counter et al., 1997; Lingner et al., 1997). Même si seulement la sous-unité protéique Est2p et TLC1 sont nécessaires pour une activité *in vitro*, des évidences montrent que Est1p autant que Est2p lient une composante structurale de l'ARN de *TLC1* (Livengood et al., 2002; Seto et al., 2002; Zhou et al., 2000). Des cellules déficientes en activité télomérase subissent un raccourcissement des télomères accompagné d'une augmentation des pertes chromosomiques et menant à la sénescence de la plupart des cellules après de 40-60 générations de croissance sans télomérase.

L'extension des télomères par la télomérase est une action essentielle et assurée par la composante ARN qui est utilisée de façon répétée pour la synthèse du brin G-riche. Le mécanisme d'extension des télomères peut se diviser en trois étapes (Figure 4). La première étape consiste à reconnaître le substrat et la région matrice de l'ARN vient alors s'apparier au simple-brin

télomérique G-riche. Ensuite, il y a le processus d'élongation, où se produit la polymérisation du brin d'une répétition d'ADN. Puis, suit le désappariement ou le ré-engagement. L'enzyme a le choix se dissocier, arrêtant ainsi le cycle d'élongation ou encore réinitier un cycle d'élongation afin d'ajouter d'autres répétitions.

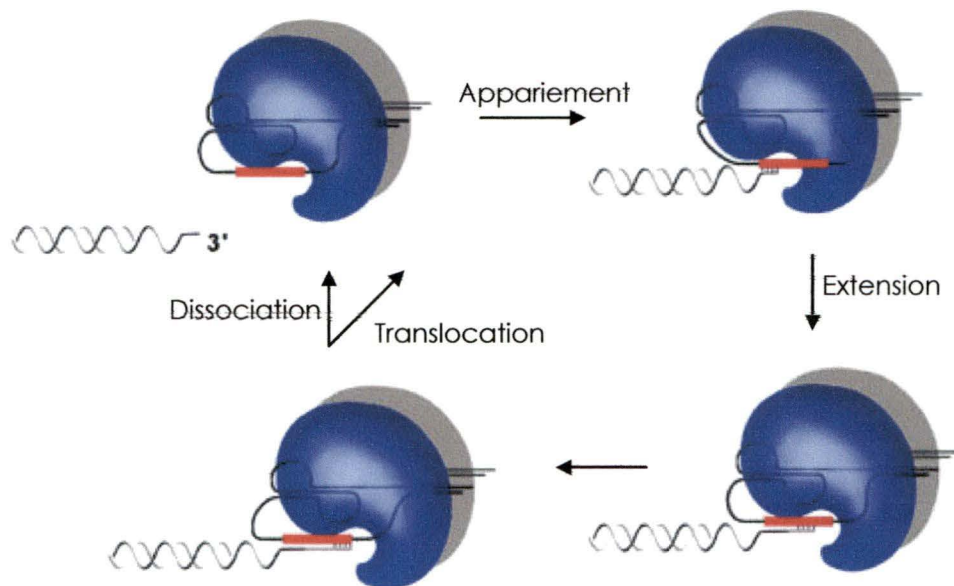


Figure 4. Cycle d'élongation de la télomérase. Le mécanisme d'action de la télomérase est divisé en trois étapes. Il y a d'abord l'appariement au substrat, l'élongation et dissociation ou translocation. Adapté de (Kelleher et al., 2002).

2.1 Les composantes protéiques de la télomérase

La télomérase est formée de plusieurs sous-unités protéiques assemblées par l'intermédiaire d'un ARN non-codant. Une seule sous-unité est responsable de l'activité catalytique, tandis que les autres mettent en œuvre des mécanismes d'action afin de réguler et de recruter la télomérase

active aux extrémités chromosomiques. Dans le cas de la levure, la sous-unité catalytique Est2p a été découverte lors d'un criblage génétique (Lendvay et al., 1996) et présente également des homologies de séquence avec la sous-unité catalytique p123 précédemment caractérisé et purifié chez *Euplotes* (Lingner et Cech, 1996). Est2p peut être divisé en quatre différents domaines (Figure 5). Deux domaines se retrouvent en N-terminale: le premier se situe à l'extrémité et est important pour l'interaction avec Est3p (Friedman et al., 2003). Le deuxième, localisé en aval, est nécessaire pour la liaison à TLC1, la composante ARN du complexe télomérase (Friedman et Cech, 1999; Livengood et al., 2002). Aussi, un domaine central, retrouvé chez toutes les reverse transcriptases, comporte des motifs catalytiques conservés (O'Reilly et al., 1999). Finalement, un dernier domaine peu conservé en C-terminale, aurait un rôle à jouer au niveau de la processivité (Peng et al., 2001).

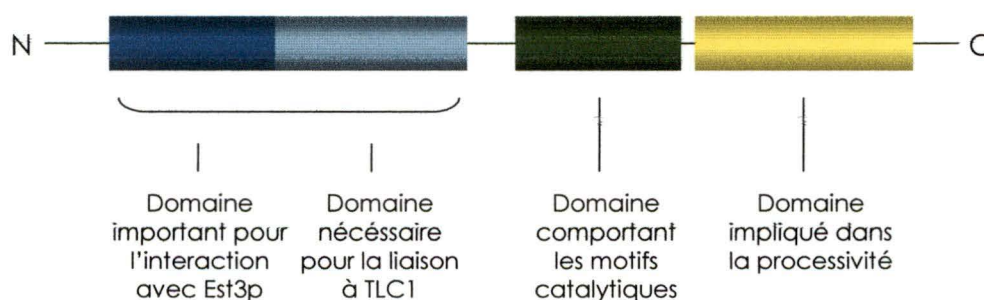


Figure 5. Domaines fonctionnels de la sous-unité catalytique Est2. Les différents domaines sont indiqués sur le schéma. La protéine Est2 a une longueur de 884 KDa. La sous-unité catalytique hTERT possède des domaines similaires.

Malgré la différence de taille de Est2p (103 kDa) avec hTERT (127 kDa), la sous-unité catalytique humaine, cette dernière possède les mêmes domaines fonctionnels. L'expression de hTERT dans les cellules somatiques est très étroitement régulée (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). En effet, l'activité télomérase dans les cellules somatiques est sérieusement limitée, contrairement aux cellules prolifératives, telles les cellules germinales, hématopoïétiques, endométriales et jusqu'à 95% des cellules cancéreuses qui expriment une activité télomérase (Broccoli et al., 1995; Counter et al., 1995; Counter et al., 1994; Kim et al., 1994; Shay et Bacchetti, 1997; Yasumoto et al., 1996).

Outre la sous-unité catalytique, les complexes télomérase sont constitués de diverses protéines accessoires. Chez la levure *S. cerevisiae*, on retrouve entre autres les protéines Est1p ainsi que Est3p non-essentiels pour l'obtention d'une activité *in vitro*. De plus, la fonction de Est3p est encore mal comprise et aucun orthologue à ce jour n'a encore été répertorié (Hughes et al., 2000).

En ce qui concerne la protéine Est1p, celle-ci aurait la capacité de lier l'ARN de *TLC1* et serait impliquée dans l'activation et le recrutement de la télomérase aux télomères via son interaction avec Cdc13p (Qi et Zakian, 2000). En effet, le complexe formé des composantes Est1p, Est2p, Est3p et *TLC1* agirait en fin de phase S pour la réplication des chromosomes et ce

grâce au recrutement de l'holoenzyme par Cdc13p aux télomères (Evans et Lundblad, 1999; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000; Taggart et al., 2002). Cette activité peut être abolie par le mutant *cdc13-2* qui présente un défaut au niveau de la réplication des télomères mais possédant toujours une activité télomérase (Lingner et al., 1997; Nugent et al., 1996). Il est possible de supprimer l'effet du mutant *cdc13-2* soit en fusionnant le domaine de liaison de Cdc13p (DBD_{Cdc13}) avec Est1p ou Est3p soit en surexprimant Est1p (Evans et Lundblad, 1999). De plus, il a été démontré que Cdc13p et Est1p peuvent co-immunoprécipiter lorsqu'ils sont surexprimés indiquant que l'augmentation du niveau de Est1p peut accroître l'interaction entre les deux protéines (Qi et Zakian, 2000). Par ailleurs, l'analyse du niveau de Est1p dans le cycle cellulaire a révélé qu'il était plutôt faible en G1 mais s'accroissait en phase S (Osterhage et al., 2006; Taggart et al., 2002). Il a donc été proposé que Est1p serait un activateur de télomérase dont le niveau d'expression dépend du cycle cellulaire. L'augmentation de son expression corrèle avec le moment où la télomérase est active, soit en fin de phase S.

Chez l'humain, on retrouve trois homologues de Est1p dont deux ont été démontré comme étant des protéines associées à la télomérase: soit Est1Ap et Est1Bp (Reichenbach et al., 2003; Snow et al., 2003). Lorsque EST1A est surexprimé, on assiste à un léger raccourcissement des télomères, qui peut être évité en co-exprimant la sous-unité catalytique (Snow et al., 2003), ainsi qu'à une déprotection des extrémités des chromosomes

résultant en leurs fusions. Comme Est1p chez la levure, Est1B interagit avec une protéine liant les télomères (Pot1p) afin de promouvoir l'accès de la télomérase à la fin des chromosomes (Snow et al., 2003).

Chez les ciliés, plus particulièrement *Tetrahymena*, la télomérase est aussi formée de différents constituants protéiques, ainsi que d'une composante ARN. Les protéines associées sont TERT, p20, p45, p65 et p75 (Figure 6) (Witkin et Collins, 2004). La liaison de la sous-unité catalytique TERT à l'ARN serait précédée de l'association de p65 avec celui-ci. En effet, il a été démontré que p65 améliorerait la liaison de TERT, la composante ARN, avec TERT (Prathapam et al., 2005).

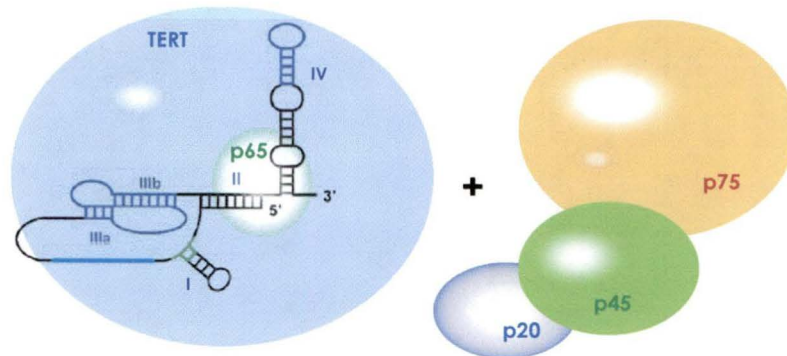


Figure 6. Composantes de la télomérase du cilié *T. thermophila*. La télomérase chez *T. thermophila* est constituée d'un ARN TER et de 5 sous-unités protéiques telles TERT (la sous-unité catalytique), p65, p45, p20 et p75.

2.2 La composante ARN de la télomérase

L'ARN de la télomérase est une composante cruciale tant au niveau de l'addition de répétitions télomériques grâce à sa matrice que dans l'assemblage du complexe. Bien évidemment, une perte de cet élément mène incontestablement à la sénescence des cellules. Initialement, le gène encodant l'ARN cloné des ciliés (Greider et Blackburn, 1989), a été identifié par la suite chez la levure (Singer et Gottschling, 1994) et chez les mammifères (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). Les ARN des différents organismes comportent certaines différences. En effet, chez les ciliés, l'ARN de 150-200 nt, une fois synthétisé par l'ARN polymérase III possède une queue poly U (Greider et Blackburn, 1989; Hargrove et al., 1999). Par contre, chez les vertébrés, l'ARN est plutôt transcrit par l'ARN polymérase II donnant un produit de 300-550 nt (Chen et al., 2000; Hinkley et al., 1998; Zaug et al., 1996). Tandis que chez la levure, l'ARN polymérase II est aussi impliquée et génère un transcrit d'environ 1300 nt. L'ARN de *TLC1* subit par la suite des étapes de maturation telle l'addition d'un capuchon 5'-triméthylguanosine ainsi que l'ajout d'une queue poly A. Cette queue poly A peut être soit conservée, formant ainsi la population de poly (A+), la moins abondante, ou soit maturée pour donner la forme la plus présente, le poly (A-) (Chapon et al., 1997; Seto et al., 1999; Singer et Gottschling, 1994). En amont de l'extrémité 3' de *TLC1* et *TER1* est retrouvé un site consensus impliqué pour l'association des protéines Sm discuté plus loin (Seto et al., 1999; Tzfati et al.,

2003). Afin d'améliorer notre compréhension de la composante ARN de la télomérase qui occupe un rôle majeur au sein de la cellule, plusieurs groupes ont tenté d'en élucider la structure secondaire. En ce qui attrait les ciliés, 4 hélices sont retrouvées (Figure 7A) : l'hélice II est nécessaire pour l'activité *in vitro*, l'hélice I occupe une fonction dans la délimitation de la matrice ainsi que dans l'association de TERT (Autexier et Greider, 1998; Autexier et Triki, 1999; Licht et Collins, 1999; McCormick-Graham et Romero, 1995). Les hélices IIIa et b forment un pseudonoeud essentiel pour l'assemblage du complexe et finalement, l'hélice IV joue un rôle dans la processivité de la télomérase et l'interaction avec la sous-unité catalytique (Gilley et Blackburn, 1999; Lai et al., 2003; Mason et al., 2003; Sperger et Cech, 2001). Chez les humains, la

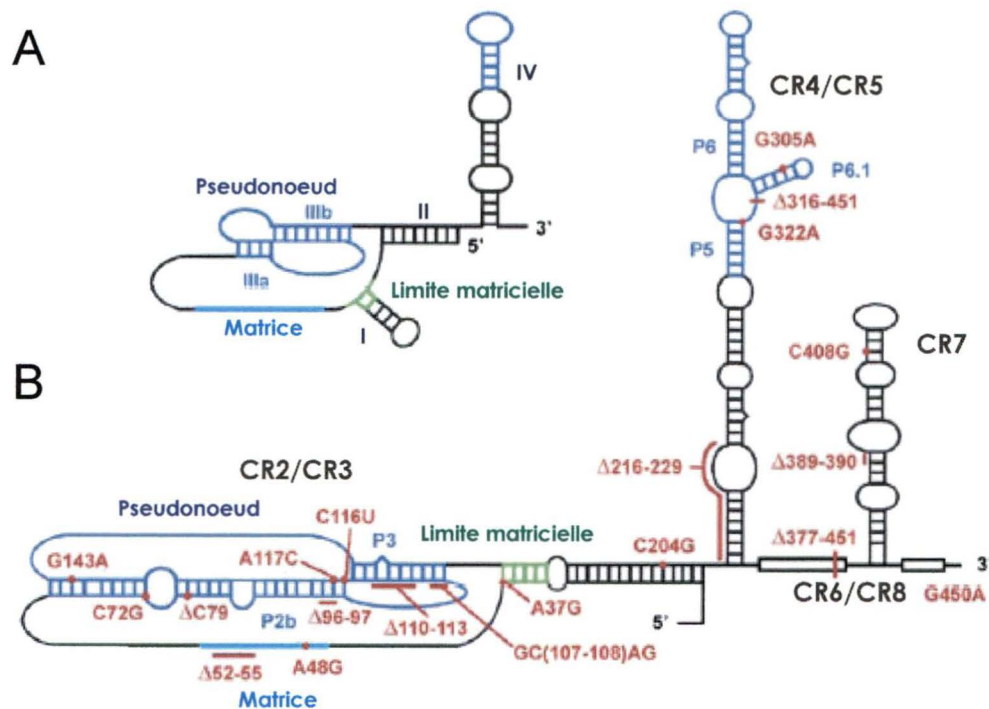


Figure 7. Modèles de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase des ciliés (A) et vertébrés (B). (A) Le nom des différentes hélices sont indiquées. (B) Les mutations qui engendrent certaines maladies ont été ajoutées à l'ARN de la télomérase. Adapté de (Theimer et Feigon, 2006).

composante ARN de la télomérase, hTR, a une longueur de 451 nt divisé en 7 domaines, très conservés parmi certaines espèces de vertébrés (CR : Conserved Region) (Figure 7B). On retrouve le domaine CR2/CR3 qui engendre un pseudonoeud, le domaine CR4/CR5 qui détient un site de haute affinité pour TERT, la boîte H/ACA (CR6/CR8) ainsi que le domaine CR7 qui occupent un rôle important dans la stabilité la maturation et à la localisation de hTR. Le pseudonoeud est composé grâce à l'interaction de deux hélices (p2b et p3) ainsi que deux boucles (j2b/3 et j2a/3). Le pseudonoeud est stabilisé par une triple hélice qui entoure la structure (Figure 8A) (Theimer et al., 2005). Il n'est cependant pas clair si ce pseudonoeud est statique ou

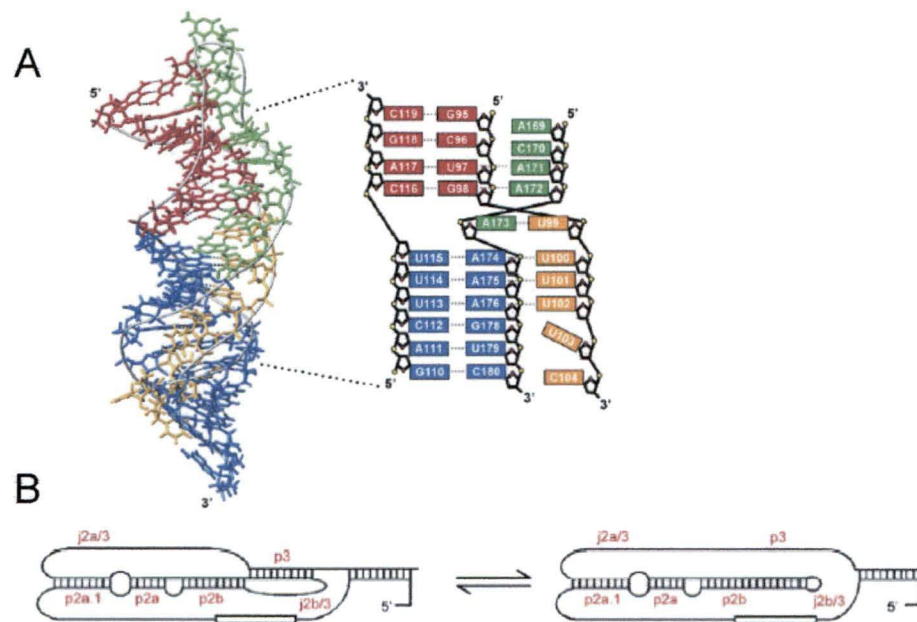


Figure 8. Formation pseudonoeud retrouvé chez l'humain. (A) Structure en formation triple hélices du pseudonoeud humain. (B) Formations possibles du pseudonoeud dynamique. À gauche : le pseudonoeud est formé, à droite : la structure est ouverte. Adapté de (Theimer et Feigon, 2006).

dynamique afin d'exercer ses fonctions (Figure 8B) (Chen et Greider, 2005; Theimer et al., 2005). La boîte H/ACA pour accomplir ses fonctions, doit lier 4 protéines associées au snoRNA : la dyskerine, hGAR1, hNOP1 ainsi que hNHP2 (Dragon et al., 2000; Henras et al., 2001; Mitchell et al., 1999; Pogacic et al., 2000). Chez les vertébrés, la matrice de l'ARN de la télomérase varie entre 8 et 11 nt (CUAACCCUAAC chez hTR), dont 8 sont parfaitement conservés. La matrice peut être subdivisée en différentes parties. En effet, les 6 premiers nucléotides participent à la polymérisation de l'ADN en tant que matrice, tandis que les 2 derniers nucléotides conservés ont une implication dans l'alignement de la matrice aux télomères (Chen et Greider, 2004b). La composante ARN chez l'humain ainsi impliquée dans le fonctionnement de la télomérase, est aussi associée à certaines maladies. Effectivement, une mutation dans l'ARN de hTR peut provoquer des maladies telles, *Dyskeratosis congenita*, *Aplastic anemia*, syndrome myéloplasmique ou encore thrombocythemia (Mutations illustrées à la Figure 7B) (Chen et Greider, 2004b; Ly et al., 2005; Marrone et al., 2005; Vulliamy et al., 2004; Vulliamy et al., 2006). Il a été établi que la plupart des mutations présentant un phénotype de maladie se retrouvait au niveau du pseudonoeud (Commenté dans (Theimer et Feigon, 2006)).

Contrairement aux ciliés et aux vertébrés, la levure *S. cerevisiae* n'a pas encore de structure secondaire définie pour son ARN TLC1. La phylogénie est une méthode très puissante pour élucider la structure

secondaire d'un ARN. Cette procédure est basée sur le fait que des ARNs aux fonctions similaires devraient avoir un repliement analogue malgré la divergence dans la structure primaire (Auffinger et Westhof, 2000). On assiste à un phénomène de covariation lorsqu'il se produit un changement de deux nucléotides en même temps lors de la comparaison de la séquence d'un ARN par rapport à un autre. Ce changement doit faire en sorte de conserver le pairage déjà observé (Westhof et Auffinger, 2000). Dans le cas de la levure, la détermination d'une structure secondaire par phylogénie peut s'avérer plus complexe à effectuer étant donné la taille de l'ARN de *TLC1* (1300 nt). Le nombre insuffisant de séquences homologues ayant une divergence adéquate dans l'évolution vient compliquer l'analyse. Par contre, de petits segments de *TLC1* ont pu être caractérisés par mutations et délétions dirigées. Par exemple, il a été démontré que la matrice est composée de 3'-ACACACACCCACACCAC-5' (Singer et Gottschling, 1994). Il y aurait aussi présence d'une limite matricielle assurant l'arrêt de transcription inverse à chaque cycle (Seto et al., 2003; Tzfati et al., 2000). La sous-unité catalytique Est2p lierait une portion centrale de *TLC1* dont la structure est toujours inconnue (Chappell et Lundblad, 2004; Livengood et al., 2002). L'hypothèse de la présence d'un pseudonoeud comme site de liaison est soulevée ici, dû au fait que chez la levure *Kluyveromyces lactis*, grâce à des analyses phylogénétiques, une structure en pseudonoeud aurait été déterminée comme étant essentielle pour l'activité télomérase (Tzfati et al., 2003). *TER1*, l'ARN de la télomérase de *K. lactis* s'est avéré un outil précieux dans la

caractérisation de certaines régions de *TLC1*. Non loin du site de liaison pour Est2p, une tige-boucle, déterminée précédemment chez *TER1*, aurait la capacité de lier Est1p (Livengood et al., 2002; Seto et al., 2002). Une deuxième tige-boucle de 48 nt interagirait avec l'hétérodimère YKu70/80 impliqué dans l'architecture des télomère ainsi que dans la réparation des bris d'ADN double-brins par NHEJ (Peterson et al., 2001). En 3' des ARNs de *TLC1* et *TER1*, on retrouve la présence d'une région simple brin, le site Sm (5'-AAUUUUUGG-3'). Cette région essentielle pour l'association des protéines Sm (Seto et al., 1999; Tzfati et al., 2003) est généralement présent chez les snRNPs (small nuclear Ribonucleoproteins) composés de snARN (small nuclear RNA) comme U1, U2 et U4/U6-U5, de protéines spécifiques ainsi que de protéines Sm. Cette particularité propose ici des similarités de *TLC1* avec les snARNs. Par ailleurs, il existe au total 7 protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) et celles-ci s'associent aux snARNs afin d'assurer la stabilité du snRNP. Leur association aux snARNs ainsi qu'à *TLC1* provoque l'hyperméthylation du capuchon 7-methyl par une méthylase qui induit la formation d'un capuchon 5' 2,2,7-triméthylguanosine (Mattaj, 1986; Plessel et al., 1994). La présence de ce site Sm favorise donc la maturation et la stabilité de l'ARN de *TLC1*. La présence du site Sm pour l'ARN *TLC1* et *TER1* suggère des voies de biogenèses communes avec les snRNPs. Par ailleurs, les voies de biogenèses de l'ARN l'humain, qui comporte un domaine H/ACA à l'extrémité 3', sont très différentes.

Malgré la caractérisation de plusieurs régions de l'ARN de la télomérase chez la levure de *Saccharomyces cerevisiae*, celles-ci composent seulement une infime partie de l'ARN rendant l'étude des fonctions et assemblage de cet enzyme plutôt ardue.

2.3 Les mécanismes de régulation de la télomérase

On assiste à différents types de régulation de la télomérase chez l'humain. Premièrement, plusieurs facteurs qui ont la capacité de lier le promoteur du gène encodant hTERT, réguleraient rigoureusement sa transcription. La présence d'une multitude de facteurs de transcription propose un taux assez varié de contrôles dépendamment du cycle cellulaire ainsi que du type de cellule (Cong et al., 1999). En effet, l'expression de la télomérase est plutôt réduite dans les cellules somatiques lors de l'embryogenèse, tandis qu'elle est induite au niveau des cellules germinales (Counter et al., 1992; Kim et al., 1994; Shay et Bacchetti, 1997). La répression ou l'activation de la transcription par différents facteurs connus constituerait la principale voie de régulation de l'expression de hTERT (Cong et Bacchetti, 2000; Misiti et al., 2000; Wang et al., 1998). Par contre, la télomérase pourrait aussi être régulée par la séquestration de la sous-unité catalytique. En effet, des données suggèrent que la biogenèse de la télomérase humaine se produirait dans le nucléole et que le relâchement de

la télomérase active de son compartiment serait une étape important pour le contrôle de son activité (Wong et al., 2002). Finalement, les protéines structurales des télomères telles TRF1 et TRF2 occuperaient aussi un rôle important dans le contrôle de l'activité télomérase (Vega et al., 2003). Effectivement, celles-ci favorisent la formation du T-loop, structure qui empêche l'accès de la télomérase aux télomères, mais qui protège aussi contre la dégradation.

En ce qui concerne la levure *S. cerevisiae*, l'activité de la télomérase est également régulée par son recrutement aux télomères mais aussi par leur accessibilité. Cdc13p fait partie des protéines impliquées dans le recrutement de la télomérase. Comme mentionné précédemment, celle-ci, par son interaction avec Est1p, mobilise la télomérase aux extrémités des chromosomes (Evans et Lundblad, 1999, 2002; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000). RPA (Replication Protein A) pourrait être un autre complexe qui faciliterait le recrutement de Est1p, régulant ainsi de façon positive la télomérase (Schramke et al., 2004). Par ailleurs, l'accessibilité des télomères est sciemment régulé par des protéines liant les régions double-brins : Rif1p, Rif2p et Rap1p. Ces composantes permettent le repliement des télomères en une forme plus compacte empêchant la télomérase de se positionner sur le brin d'ADN. En effet, leur absence provoque un rallongement des télomères (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). D'un autre côté, à cause du problème réplcatif terminal, les télomères vont raccourcir, prévenant la liaison

des protéines rendant maintenant disponible l'accès aux télomères (Marcand et al., 1997; Ray et Runge, 1998).

Par contre, Cdc13p occupe différentes fonctions. En se liant à la région simple-brin des télomères, l'élongation des extrémités est inhibée. De plus, des études tendent à démontrer que Cdc13p n'agirait pas seul. En effet, Cdc13p serait responsable de l'extension du brin G-riche et par la suite Stn1p permettrait la synthèse du brin C-riche et bloquerait l'allongement des répétitions par la télomérase (Chandra et al., 2001). Cette hypothèse est soutenue par le fait que Stn1p et Est1p sont en rivalité pour le même site de liaison à Cdc13p (Pennock et al., 2001).

Devant l'absence de modèle de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure, nous avons entrepris, dans notre laboratoire, des travaux afin d'élaborer un modèle de la structure secondaire de l'ARN TLC1. L'élaboration d'un modèle pourrait s'avérer un outil efficace dans l'étude de la structure et fonction de l'ARN de la télomérase.

Suite à la proposition d'une structure secondaire, nous nous sommes questionnés sur la structure tridimensionnelle de TLC1. En effet, l'ARN de la télomérase doit sûrement adopter différentes conformations afin d'effectuer ses fonctions.

Le modèle de la structure secondaire établie dans le laboratoire nous a permis de positionner les différents éléments connus de la télomérase sur

l'ARN TLC1. Nous avons constaté qu'il y avait plusieurs grandes régions sans protéines connues qui s'y liaient. Nous avons donc entrepris de mettre au point une méthode de purification du complexe afin de découvrir de nouveaux partenaires, mais aussi afin d'étudier l'assemblage du complexe à travers le cycle cellulaire.

Chapitre I

- **Implication dans la détermination de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*.**

Préambule

La structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae* a été déterminée grâce à une analyse phylogénétique. L'isolation de 7 différents homologues de TLC1 a permis de suggérer un modèle d'étude pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'assemblage et d'action du complexe. Il faut d'abord s'assurer que les gènes isolés soient exprimés dans la cellule par analyse biochimique. Par ailleurs, pour faire une analyse phylogénétique, il faut s'assurer d'avoir suffisamment de séquences homologues au gène étudié. Les gènes homologues utilisés dans l'étude doivent être raisonnablement éloignés dans l'évolution afin de donner un taux approprié de covariations, mais aussi assez proches afin d'être en mesure d'effectuer les mêmes fonctions indiquant ici la probabilité d'une structure similaire. Le choix d'homologues appropriés pour l'étude d'un gène se fait généralement par test de complémentation ainsi que par vérification de l'homéostasie des télomères. De plus, afin d'assurer un alignement adéquat des séquences pour une analyse optimale, il est primordial de déterminer des points d'ancrage telles les extrémités 5' et 3' des différents homologues.

Dans cette étude, j'ai réalisé une partie des clonages, les tests de complémentation, la détermination de la longueur des télomères ainsi que la cartographie des extrémités 5' des homologues de TLC1.

Objectif spécifique

Dû à sa très grande taille et au manque de bassin de population de séquences homologues, la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas encore été déterminée. L'objectif du projet était d'abord d'isoler les gènes homologues des souches des « sensu stricto », qui sont apparentés à *S. cerevisiae*, pour éventuellement déterminer une structure secondaire de TLC1. L'isolation de ces gènes a été réalisé par Alain T. Dandjinou. Par la suite, j'ai vérifié que les séquences isolées étaient bel et bien des homologues de TLC1. Finalement, grâce à des analyses biochimiques, j'ai déterminé les extrémités 5' des ARNs afin de faciliter l'alignement de séquences sur lequel repose l'analyse phylogénétique.

Matériel et méthodes

Souches et plasmides

La souche utilisée pour les tests de complémentation est dérivée CSHY76 (*MATa/MAT α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 tlc1 ::LEU2/TLC1 rad52 ::TRP1/RAD52*), gracieuseté de C. Greider. Les souches de levures « sensu stricto » utilisées sont *S. cerevisiae* (S288C et SK1), *S. paradoxus* (CBS 432), *S. cariocanus* (UFRJ 50791), *S. mikatae* (IFO 1815), *S. kudriavzevii* (IFO 1802), *S. bayanus* (CBS 7001) et *S. pastorianus* (DBVPG 6560). Les souches de levure ont été transformées utilisant la méthode avec du LiAc/ssDNA/PEG décrit selon (Gietz et Woods, 2002). Les cellules haploïdes, utilisées pour les tests de complémentation, ont été générées par sporulation de la souche CSHY76 dans un milieu 0,5% KOAc à 23°C puis les tétrades engendrées ont été séparées par dissection. Les homologues de TLC1 ont été clonés dans le plasmide pADCEN26; dérivé de pRS316 (marqueur nutritionnel URA3) (Sikorski et Hieter, 1989), dans lequel a été inséré un fragment de 327 pb contenant la région terminatrice de transcription du gène *ADH1*. Les plasmides contenant les gènes homologues de l'ARN de la télomérase des souches *S. cerevisiae* (S288C), *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudravzevii*, *S. bayanus* et *S. pastorianus* ont été clonés dans le plasmide pADCEN26 et sont nommés, dans le même ordre pADCEN36, pADCEN35, pADCEN42, pADCEN43, pADCEN44, pADCEN45, pADCEN46 et pADCEN49 respectivement.

Tests de complémentation

Les différents plasmides contenant TLC1, ses différents homologues, ainsi qu'un plasmide vide comme contrôle négatif (pADCEN26) sont transformés dans la souche CSHY76. Les cellules haploïdes, utilisées pour les tests de complémentation, ont été générées par sporulation de la souche CSHY76 dans un milieu 0,5% KOAc à 23°C puis les tétrades engendrées ont été séparées par dissection. Les spores contenant les délétions des gènes encodant pour TLC1 et RAD52, ainsi que le plasmide, sont isolés sur milieu YC-ura-trp-leu. Ensuite, les cellules choisies sont striées sur un milieu synthétique YC-uracile (Sambrook et al., 1989) et incubées pendant 3 jours pour permettre la formation d'une colonie, soit environ 20 générations. Le nombre de générations a été évalué de façon à ce qu'une colonie de 2 mm proviendrait d'une cellule qui se serait divisée 20 fois. De cette façon, les cellules sont passées jusqu'à environ 100 générations sur milieu YC-uracile pour dépasser le seuil de sénescence qui se situe autour de 40-60 générations pour le contrôle négatif. Ceci permet d'évaluer la capacité des homologues à remplir les fonctions de TLC1. Les cellules qui ont été en mesure de croître au-delà de 100 générations, sont striées sur milieu 5' FOA (acide 5'-fluoroorotique) afin de faire perdre le plasmide aux cellules. Les cellules portant le gène URA3, convertissent le 5-FOA en fluoro-déoxyuridine, une substance toxique pour celles-ci (Boeke et al., 1987). Grâce à cette particularité, il est possible de sélectionner les cellules qui ont perdu le plasmide avec le marqueur nutritionnel *URA3*. Si les cellules sénescent, on aura alors la certitude que la croissance précédente était dépendante

du plasmide. Deux colonies indépendantes de chaque passage ont été inoculées afin d'évaluer l'homéostasie de la longueur des télomères décrit plus loin.

Préparation de l'ADN et analyse de la longueur des télomères

Des colonies isolées sur boîte de pétri des souches provenant des passages de complémentation ont été piquées et inoculées dans des cultures liquides de 5 mL dans un milieu synthétique YC-uracile. Les cellules ont été centrifugées à 13, 000 x g, lavées avec de l'eau bidistillé stérilisé et l'ADN génomique en a été extrait par la méthode de billes de verre suivant le protocole de (Hoffman et Winston, 1987). Plus en détail, le culot a été resuspendu dans 200 μ L de tampon (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) et dans 300 μ L de phénol/chloroforme. 5-10g de billes de verre sont ajoutés suivi d'une session alternative de vortexage et d'incubation sur glace (10 fois 30 sec). Le liquide a été recueilli et les billes ont été rincée avec 100 μ L de TE (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA) puis centrifugé à 13, 000 x g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été isolé et l'ADN précipité avec de l'éthanol salé 70%. Les culots d'ADN recueillis sont resuspendus dans 20 μ L de TE. L'ADN a été digéré par l'enzyme de restriction *Xho*I pour libérer les fragments terminaux de restriction (TRFs) et 1 μ g de cet ADN a été séparé sur un gel d'agarose 1%. L'ADN a ensuite été transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Amersham Hybond N+). Les TRFs ont été visualisés par hybridation à 42°C (Wellinger et al., 1993) à l'aide d'une sonde d'ADN télomérique de levure pCT300 (Wellinger et al., 1993)

(digéré par *EcoRI*) marquée par extension d'amorces aléatoires (Feinberg et Vogelstein, 1983), ajoutée dans la solution d'hybridation (50% formamide, 5x SSC, 1x Denhardt's, 1 mg/ml ADN de sperme de hareng, 2% SDS, 0.5% de lait en poudre dans l'eau stérile). Ensuite, la membrane est lavée avec la solution 2X SSC pendant 20 min à température pièce. Puis, deux lavages de 30 min à 55°C sont effectués avec une solution composée de 0,1X SSC et 0,1% SDS.

Isolation d'ARN et Northern Blot

Des cultures liquides de 5 mL dans un milieu approprié ont été poussées à 30°C. Les cellules ont été centrifugées à 13,000 x g et rincées à l'eau bidistillé stérile. L'ARN total a été extraite par la méthode des billes de verre et phénol/chloroforme décrit dans (Rose et Broach, 1990). Brièvement, les cellules sont lavées deux fois dans 20 mL de tampon LETS froid (0,1 M LiCl, 10 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,2% SDS). Le culot des cellules est ensuite resuspendu dans 300 µL de tampon LETS froid et 300µL de phénol/chloroforme. 5-10g de billes de verre sont ajoutées et les cellules sont brisées par dix rondes alternées : 30 sec vortex, 30 sec sur glace. Le liquide est récupéré et les billes sont lavées avec 200 µL de LETS froid. Le liquide est ensuite centrifugé 5 min à 4°C, la phase aqueuse est récupérée. 400 µL de phénol/chloroforme sont ajoutés, puis après centrifugation, la phase aqueuse est gardée et 400 µL de chloroforme est ajouté. La phase aqueuse est encore une fois recueillie et l'ARN est précipité grâce à de l'éthanol salé 70% au LiCl. Puis, après centrifugation, le culot est précipité et resuspendu dans l'eau

bidistillé stérilisé traité au DEPC (Sambrook et al., 1989). La concentration de l'ARN est déterminée par spectrophotomètre à D.O. (260 nm). La valeur obtenue est ensuite divisée par 40 pour avoir une concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Sambrook et al., 1989). 15 μg d'ARN total sont séparés sur un gel de polyacrylamide/8M urée 4% et transféré sur membrane de nylon (Amersham Hybon N+) par transfert en champs électrique à 100V durant 24h. Ensuite, la membrane a été irradiée aux rayons U.V. et colorée au bleu de méthylène pour visualiser la présence des ARNr 18S et 25S afin de s'assurer de la qualité du transfert. Les ARNs étudiés ont ensuite été observés grâce à l'hybridation à 55°C d'une sonde composée des locus des différents homologues de TLC1 (Dandjinou et al., 2004) marqué par extension d'amorces aléatoires (Feinberg et Vogelstein, 1983). Les différentes sondes ont été incubées en même temps lors de l'hybridation dans la solution d'hybridation (0,6M NaCl, 0,12M Tris-HCl, 0,008M EDTA 0,25 mg/ml ADN de sperme de hareng, 0,1% SDS, 10X Denhart's). La membrane a été lavée dans la solution de lavage (0,75M NaCl, 0,15M Tris-HCl, 0,01M EDTA, 0,1% SDS) 2 fois 20 min à 55°C. La membrane est ensuite exposée dans une cassette avec un autoradiogramme à -80°C.

Oligonucléotides	Séquences 5'-3'	Souches des ARN
BYTLC166REV	CGATTAAGCAAACGCAAC	<i>S. cerevisiae</i>
PARATLC166REV	CAACTAAGCAAACGCAAC	<i>S. paradoxus</i>
CARITLC166REV	CAACTAAGCAAACGCGAC	<i>S. cariocanus</i>
MIKATLC166REV	GCTAGAAAGCAAATGTAAC	<i>S. mikatae</i>
KUDRTLC166REV	CTAGTAACTAACGTGAC	<i>S. kudravzevii</i>

Tableau 2. Oligonucléotides utilisés pour les extensions d'amorces afin de déterminer l'extrémité 5' des ARNs des souches des « sensu stricto ».

Détermination de l'extrémité 5' des ARNs par extension d'amorces

Des amorces spécifiques pour chacun des ARNs homologues de TLC1 qui s'hybrident à environ 20 nt de l'extrémité 5' (relatif à l'extrémité 5' de *S. cerevisiae*), sont radiomarquées au γ - ^{32}P ATP avec la T4 PNK à 37°C, tel que décrit dans (Dionne et Wellinger, 1996). Les amorces utilisées sont détaillées dans le Tableau 2. **1)** D'abord, 2 pmol de ces amorces sont hybridées à 5-15 μg d'ARN total de levure à 65°C 5 min, puis à 37°C pendant 30 min dans un tampon (0,625M Tris-HCl pH 8.0, 8,75mM KCl) dans un volume final de 7 μl . **2)** Ensuite, 3 μl de la réaction d'hybridation (1) est ensuite mélangé à 0,5 μl de tampon (1,25M Tris-HCl pH 8.0, 17,5mM KCl), 0,5 μl de DTT, 1 μl MgCl_2 , 0,5 μl d'un mélange de dNTP à 2,5mM, 0,25 μl 1mg/ml Actinomycine D, 0,25 μl de reverse transcriptase (Roche). Le mélange (2) est incubé à 42°C durant 40 min pour l'extension des amorces. **3)** Après l'incubation à 42°C, les produits d'extensions (2) sont ensuite traités 10 min à 42°C à la RNase A (1 μl EDTA 0,5M, 1 μl RNase A 10mg/ml) et 10 min à 42°C à la protéinase K (5 μl SDS 0,2%, 1 μl protéinase K 10 mg/ml). Les produits (3) sont précipités à l'éthanol salé 70% au NaAc 3M. 2,5 μl des produits sont analysés sur gel de polyacrylamide/8M urée 8% à 45W en parallèle avec une réaction de séquençage par la méthode de terminateur de chaînes de Fred Sanger. Cette réaction est conçue avec le même oligonucléotide que la réaction d'extension d'amorces sur le clone approprié de façon à déterminer au nucléotide près l'extrémité 5' (Référé dans Sambrook et al., 1989). Comme contrôle positif, un transcrit d'ARN sens, débutant à la position -122 dans le locus de l'ARN TLC1, a été utilisé. Le plasmide utilisé est le SLB010

digéré par Sall (NEB) selon les conditions du manufacturier. Le transcrit d'ARN a été synthétisé à l'aide du produit Megascript T7 kit (AMBion).

Résultats

Les gènes isolés comme étant des homologues de TLC1 sont exprimés. Afin d'effectuer une analyse phylogénétique, un certain nombre de souches ont été identifiées dans lesquelles les séquences d'ARN sont suffisamment semblables pour être alignées, mais assez divergentes pour obtenir un bassin important de covariations. Alain T. Dandjinou a isolé les différents gènes par amplification dans les gènes situés de part et d'autre des homologues de TLC1 (Dandjinou et al., 2004). En effet, la divergence dans les séquences à travers l'évolution est beaucoup moins grande chez les gènes qui encodent pour une protéine que pour un ARN (Cliften et al., 2001). La méthode d'amplification s'est avérée très efficace (voir données supplémentaires dans Dandjinou et al., 2004). Il fallait ensuite vérifier si ces séquences étaient bel et bien des homologues de TLC1. Nous avons donc premièrement déterminé si ces gènes étaient exprimés, et ce par buvardage de type Northern. Donc, l'ARN total des souches a été extraites par méthode de billes de verre, séparé sur gel de polyacrylamide et transféré sur membrane qui a été hybridé avec l'ADN des locus des différents homologues de TLC1 isolées par PCR. Les différentes sondes ont toutes été hybridées en même temps sur la même membrane (Figure 9). Premièrement, une bande majeure a été détectée, confirmant l'expression du gène. Deuxièmement, la taille des bandes détectée dans la deuxième piste est très similaire à celle de l'ARN de *TLC1* déterminée précédemment. De plus, la bande majeure détectée dans les autres pistes

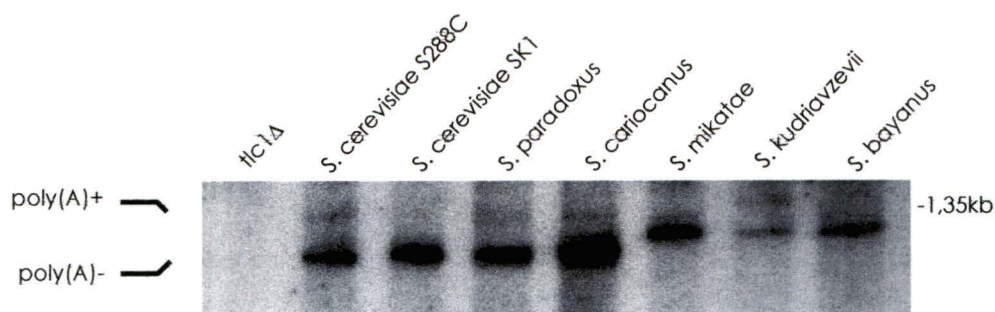


Figure 9. Expression des différents ARNs homologues à TLC1 des souches des « sensu stricto ». ARN total des souches de « sensu stricto » migré sur gel de polyacrylamide 4%, puis transféré sur membrane et hybridé avec des sondes spécifiques pour chaque homologue de TLC1. Chaque piste du gel est identifiée avec le nom des souches d'où provient l'ARN. La souche sans gène *TLC1* (*tlc1Δ*) démontre bien que l'ARN n'y est pas exprimé (contrôle négatif).

est sensiblement à la même taille, suggérant fortement que les gènes amplifiés sont probablement des homologues. Par ailleurs, la taille des bandes correspond habilement à la longueur des gènes isolés déterminé subséquentement par séquençage. Par ailleurs, une légère bande apparaît juste au-dessus de la bande majeure dans les pistes pour les ARNs des souches de *S. cerevisiae* S288C, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* et *S. bayanus*. Il a été démontré chez *S. cerevisiae* que cette bande correspond à une forme allongée et polyadénylée de TLC1 (Chapon et al., 1997). Par contre, cette bande n'est pas visible pour les ARNs des souches de *S. cerevisiae* SK1 et *S. mikatae*. Cependant, aucune autre expérience n'a été réalisée afin de confirmer cette hypothèse.

La plupart des ARN homologues sont en mesure d'effectuer les fonctions de TLC1. Dans le but de confirmer que les gènes amplifiés étaient des homologues fonctionnels de TLC1, nous avons entrepris des tests de complémentation dans la levure. En effet, la phylogénie est basée

sur le fait que des ARNs qui possèdent les mêmes fonctions, devraient avoir inévitablement la même structure. Dans un premier temps, les différentes séquences ont été clonées dans un vecteur centromérique en amont du terminateur de transcription du gène *ADH1* afin d'éviter toute transcription qui pourrait être générée par le plasmide. Les plasmides contenant les différents homologues ont donc été transformés dans une souche hétérozygote pour *TLC1* et *RAD52*, ce dernier impliqué dans la voie de recombinaison homologue (Le et al., 1999). Une fois les souches sporulées et les spores séparées, celles contenant la double délétion ainsi que le plasmide, ont été passées jusqu'à 100 générations. Par exemple, le contrôle positif est en mesure de pousser au-delà de 60 générations, tandis que le contrôle négatif, la souche avec le plasmide seul, meurt autour de 40-60 générations (Figure 10).

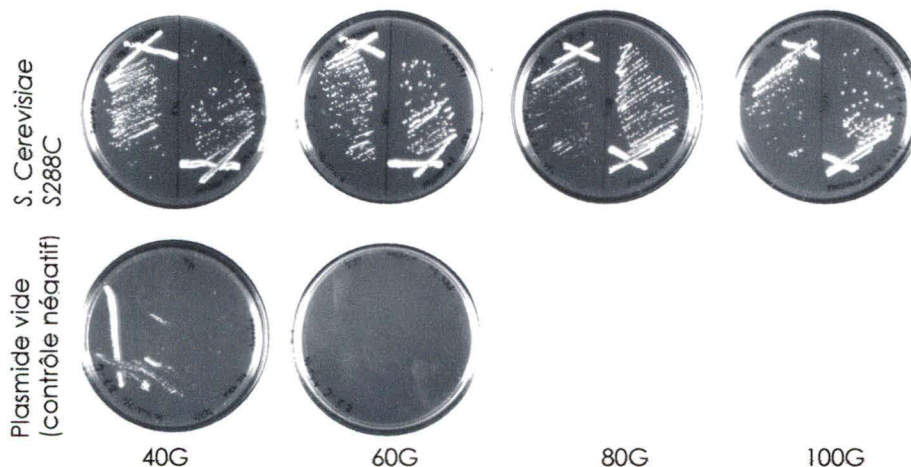


Figure 10. Contrôles de complémentation des homologues de *TLC1* dans la souche *S. cerevisiae* S288C. Le contrôle positif, la souche ayant le plasmide avec le gène *TLC1* est en mesure de pousser jusqu'à 100G. Par contre, le contrôle négatif, le plasmide sans homologue de *TLC1*, meurt autour de 40-60G.

En ce qui concerne la plupart des différents homologues, ils ont été en mesure de dépasser le point critique de sénescence et ont réussi à atteindre les 100 générations, excepté pour le locus dérivé de *S. bayanus* (Tableau 3). La perte du plasmide par passage sur 5-FOA confirme que la complémentation est dépendante du plasmide pour chacune des souches qui ont poussées au-delà de 100 générations (Tableau 3). Afin de vérifier l'efficacité des différents homologues à pouvoir remplacer les fonctions de TLC1, nous avons déterminé leur capacité à maintenir la longueur des télomères à 20G et 100G suite aux passages de complémentation. En effet, l'analyse de la taille des télomères pourra nous indiquer de façon plus précise la capacité des différents homologues à maintenir la fonction de TLC1. Des télomères de la même longueur que ceux des souches de type sauvage indique que l'ARN n'a aucune difficulté à remplir ses

	Generations	<i>S. cerevisiae</i> S288C	Plasmide vide	<i>S. cerevisiae</i> SK1	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. cariocanus</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. kudriavzevii</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. pastorianus</i>
YC-ura	20G	++	+	++	++	++	++	++	++	++
	40G	++	+/-	++	++	++	++	++	+	++
	60G	++	-	++	++	++	++	++	+/-	++
	80G	++	---	++	++	++	++	++	-	++
	100G	++	---	++	++	++	++	++	---	++
FOA	20G	+/-	---	+/-	+/-	+	+	+/-	---	-
YC-leu-trp	40G	+/-	---	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	---	---
	60G	-	---	-	-	-	-	-	---	---

Tableau 3. Complémentation des homologues de TLC1 dans la souche *S. cerevisiae* S288C.

Les souches de *S. cerevisiae* délétées de *TLC1* et *RAD52* contenant un plasmide avec un gène homologue à *TLC1* ont été poussées jusqu'à 100 générations sur milieu solide YC-ura. Les cellules ont ensuite été passées sur milieu 5-FOA, puis sur YC-leu-trp afin de s'assurer de la dépendance du plasmide pour la complémentation. Un plasmide contenant *TLC1* est utilisé comme contrôle positif tandis qu'un plasmide vide est utilisé comme contrôle négatif. Légende : ++ : bonne croissance (similaire au contrôle positif) ; + : croissance légèrement inférieure au contrôle positif ; +/- : croissance difficile, cellules en sénescence ; - : absence de croissance.

fonctions. Par contre, des télomères plus courts démontrent une lacune dans les fonctions de la télomérase. L'homéostasie de la longueur des télomère a été visualisée grâce à un buvardage de type Southern (Figure 11A et B). En effet, des cultures liquides ont été conçues à partir des colonies aux passages 20 et 100. Ensuite, l'ADN génomique a été extrait par méthode de billes de verre et digéré par l'enzyme *XhoI* afin de libérer les fragments terminaux de restriction (TRFs). L'ADN a été séparé sur gel, puis transféré sur membrane qui a été incubée avec une sonde télomérique. La souche sans ARN de télomérase (contrôle négatif, piste 2,

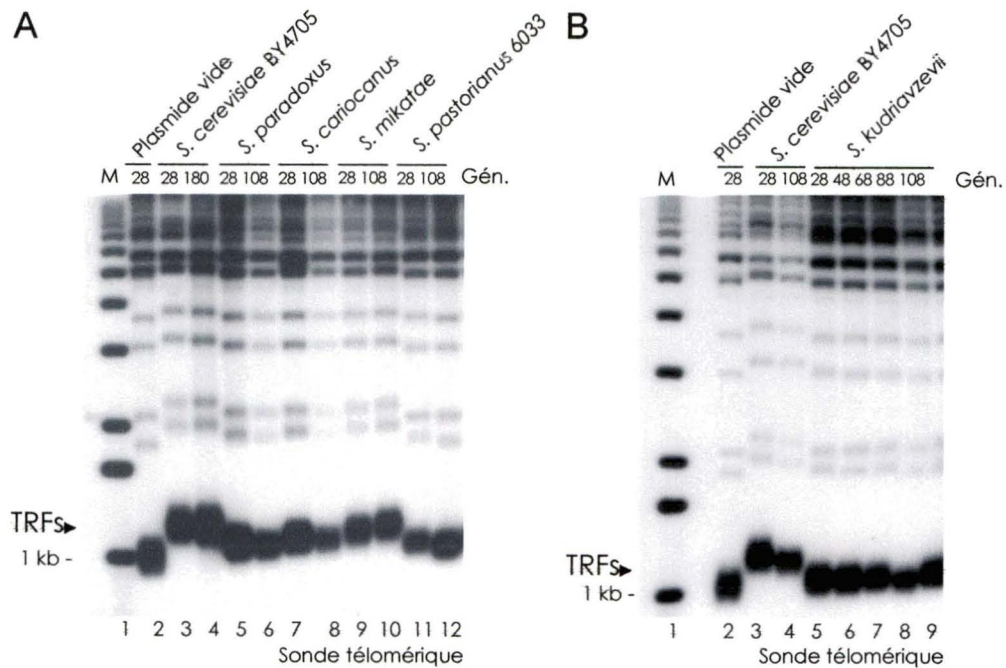


Figure 11. Longueur des TRFs des souches complémentées par les homologues de TLC1 dans une souche *S. cerevisiae* S288C. L'ADN des souches *S. cerevisiae* délétées de *TLC1* et *RAD52* comprenant un plasmide avec les différents homologues de *TLC1*, digéré avec l'enzyme *XhoI* et migré sur gel 1% et hybridé avec une sonde télomérique. (A) ADN des souches extrait à toutes les 28 et 108 générations. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder, piste 2 : contrôle négatif, pistes 3-4 : *S. cerevisiae* S288C (contrôle positif), pistes 5-6 : *S. paradoxus* pistes 7-8 : *S. cariocanus*, pistes 9-10 : *S. mikatae*, pistes 11-12 : *S. pastorianus*. (B) ADN des souches extrait à toutes les 20 générations jusqu'à 108 générations. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder, piste 2 : contrôle négatif, pistes 3-4 : *S. cerevisiae* (contrôle positif), pistes 5-9 : *S. kudriavzevii*.

Fig. 11), poussée aux environs de 20 générations, démontre des TRFs très courts. La souche contrôle avec TLC1 (pistes 3-4, Fig. 11), exhibe des TRFs de type sauvage, soit d'une taille se situant autour de 1,3 kb. Par contre, les souches avec les homologues ont des TRFs de longueurs inférieures à celle du contrôle positif, suggérant une complémentation incomplète. La souche avec l'ARN de *S. mikatae* (pistes 9-10, Fig. 11A) possède des TRFs plus courts que celles avec l'ARN de *S. cerevisiae*, mais légèrement supérieurs à ceux des autres souches. Par contre, en accord avec l'absence de sénescence, le maintien de la longueur semble d'ailleurs plutôt stable à travers les générations (Figure 11B).

Détermination des extrémités des ARNs homologues. La phylogénie est dépendante d'un alignement adéquat des diverses séquences utilisées pour l'étude. En vue d'avoir un alignement approprié, il est nécessaire de déterminer où débutent et se terminent les ARNs des homologues.

Des extensions d'amorces ont été effectuées pour identifier l'extrémité 5' des ARNs. Les expériences ont été faites en triplicata pour chacun des ARNs. Le 5' de l'ARN de *TLC1* est similaire à celui proposé précédemment (Singer et Gottschling, 1994) (Figure 12). L'extrémité des ARNs des souches de *S. paradoxus* et *S. cariocanus* sont identiques à *TLC1* (Figure 13). Par contre, pour les ARNs des souches telles *S. mikatae* et *S. kudriavzevii*, l'extrémité 5' est légèrement plus en amont. L'extrémité 5' de l'ARN homologue de chez l'espèce *S. paradoxus*, semble être plutôt faible et sur le gel présenté, plusieurs bandes de dégradations

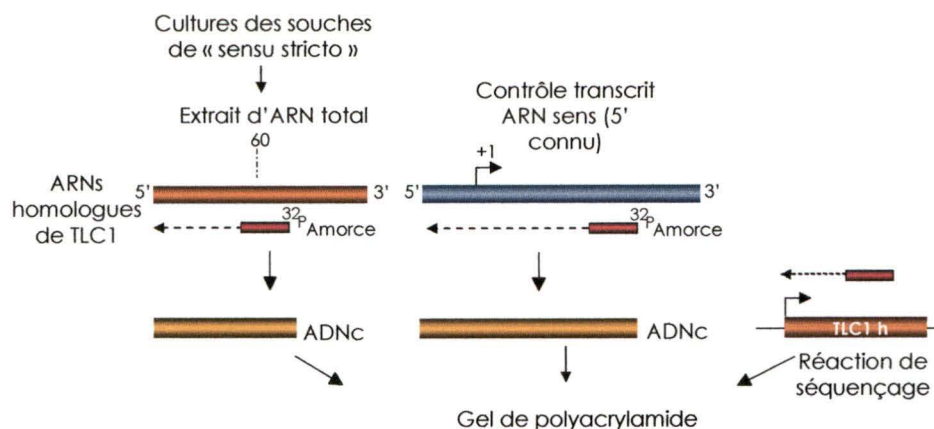


Figure 12. Détermination des extrémités 5' des ARNs chez les souches « sensu stricto ». Schéma des expériences pour la détermination de l'extension 5' des ARNs. Une réaction d'extension ainsi qu'une réaction de séquençage sont migrées sur un gel de polyacrylamide. Un transcrit d'ARN sens est aussi ajouté comme contrôle.

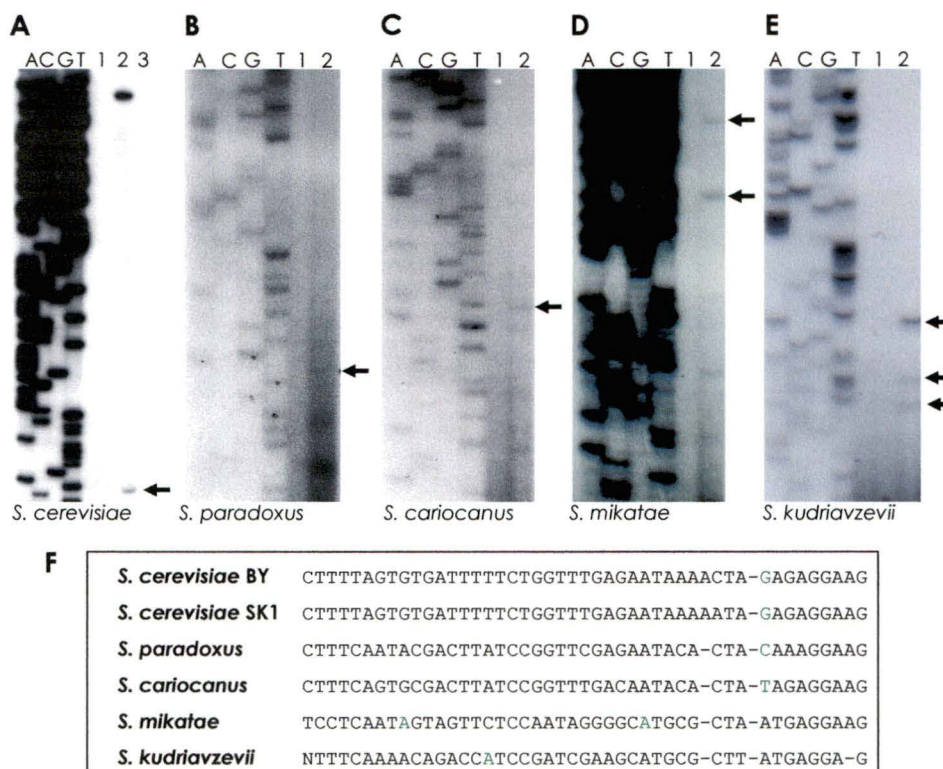


Figure 13. Extrémités 5' des ARNs chez les souches « sensu stricto ». (A) Réaction de séquençage (pistes A,C,G,T) et d'extension d'amorce pour l'ARN TLC1, mis sur gel de polyacrylamide 8%. Piste 1 : contrôle sans ARN, piste 2 : contrôle d'ARN sens, piste 3 : réaction d'extension pour l'ARN TLC1. Résultats d'extension d'amorce pour les ARNs de (B) *S. paradoxus* (C) *S. cariocanus* (D) *S. mikatae* (E) *S. kudriavzevii*. Les flèches indiquent le signal de l'extrémité 5' des ARNs étudiés. (B-E) La piste 1 représente le contrôle sans ARN, piste 2 la réaction d'extension pour les ARNs homologues de TLC1. (F) Résumé des différentes extrémités 5' des ARNs obtenus par extension d'amorces sur les ARNs des différentes souches des « sensu stricto ». Les nucléotides représentant l'extrémité 5' sont indiqués en vert.

semblent être observées. Cependant, la légère bande est le premier signal observé sur le gel à partir du haut et, de plus, concorde avec le +1 de l'ARN de *TLC1*. Pour cette raison, nous avons défini cette bande comme étant l'extrémité 5' de l'ARN homologue chez *S. paradoxus*. Étant donné que la plupart des souches ont le même +1 que *TLC1*, c'est celui-ci qui a été utilisé pour aligner les séquences pour la détermination de la structure.

L'extrémité 3' quant à elle a déjà été déterminée précédemment (Bosoy et al., 2003). À l'aide de cette étude, nous avons pu observer que seulement quelques nucléotides séparaient l'extrémité 3' du site Sm. La conservation à 100% du site Sm entre les séquences a permis d'utiliser ce site comme point d'ancrage pour l'alignement à l'extrémité 3'.

Finalement, l'alignement des séquences ainsi que les études de covariations ont été effectués manuellement par Alain T. Danjinou et grâce à des outils bioinformatiques basés sur la prédiction d'hélices thermodynamiquement stables. De plus, des études biochimiques ont confirmées les résultats obtenus antérieurement (voir annexe Dandjinou et al., 2004). La structure secondaire de *TLC1* ainsi prédite est composée de sept hélices principales organisées autour d'un domaine central (I-VII) (Figure 14). Les hélices I à VI sont toutes reliées au domaine central, tandis que l'hélice VII est jointe à l'hélice I par une région simple-brin. La majorité des hélices sont séparées en segments. Les extrémités 5' et 3' sont situées à proximité, caractéristique retrouvée chez la plupart des ARNs non-codant chez la levure (Yeh et Lee, 1992). L'ARN de *TLC1* peut

être divisé en trois régions fonctionnelles. La première est le core central comprenant la matrice et les hélices III, IVa-IVc, V et VI qui sont en mesure de lier les protéines Est2p et Est1p, essentielles à l'activité *in vivo* de l'enzyme (Lingner et al., 1997). Les hélices V et VI formeraient hypothétiquement un pseudonœud pour l'association de la sous-unité catalytique. La deuxième région est composée des segments IIa-IIc. Une tige-boucle du segment IIc a été démontré pour lier le complexe YKu (Peterson et al., 2001). La troisième région constituée des segments VIIa-VIIc est séparée du domaine central par l'hélice I et aurait probablement un rôle dans la maturation et la localisation de l'ARN.

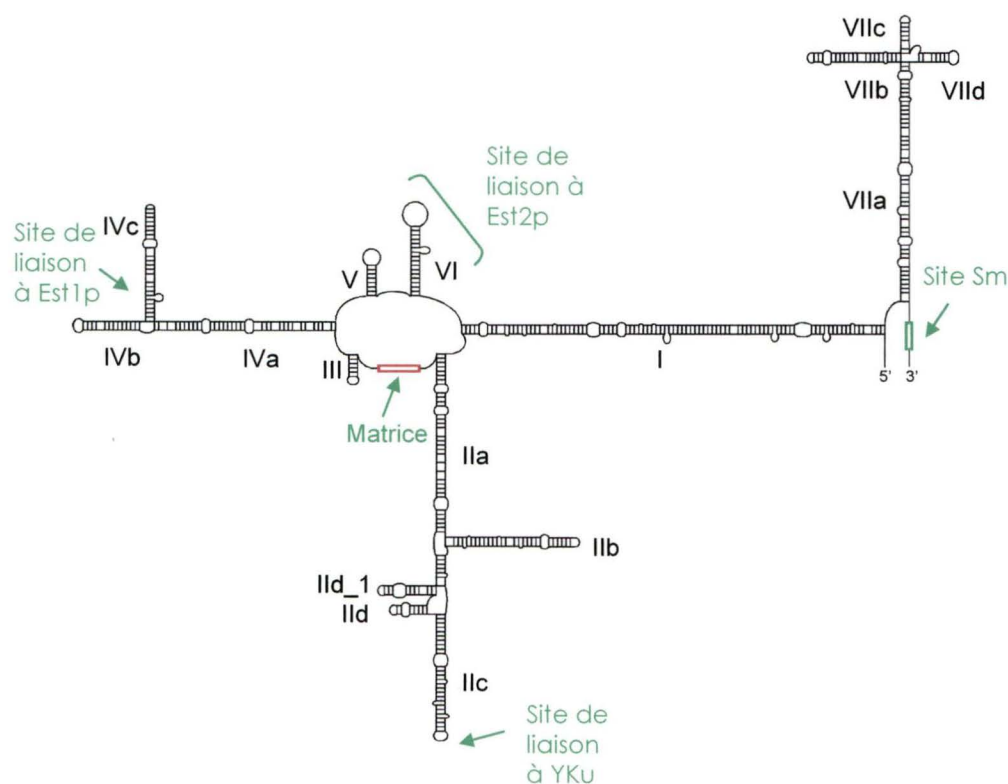


Figure 14. Modèle proposé pour la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*. Structure secondaire de TLC1 obtenue par analyse phylogénétique. La structure possède 7 hélices (I à VII), qui peuvent être compartimentées en segments (a à d). Les sites de liaison à Est1p, Est2p, YKu et les protéines Sm sont indiqués ainsi que la région matrice.

Chapitre II

- **Recherche de mutants sensibles au froid dans le but d'étudier la structure tridimensionnelle de l'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae*.**

Préambule

Dans le chapitre précédent, un modèle de la structure secondaire de la télomérase a été proposé. Ce modèle suggère l'existence de divers éléments au sein de la structure tels des hélices ainsi que des segments. Afin d'étudier la structure tertiaire des ARNs ainsi que des interactions intramoléculaires, la génération de mutants thermosensibles peut être une excellente méthode. L'ARN de TLC1 est très grand (soit ~1 300 nt) et seules certaines régions sont capitales pour le bon fonctionnement de l'enzyme. Donc, la génération de mutants thermosensibles peut nous permettre d'identifier les interactions importantes pour les différentes fonctions. En effet, la température de croissance des cellules peut affecter la dynamique des interactions entre les nucléotides. Une méthode qui a fait ses preuves afin d'évaluer la structure tertiaire pour l'ARN U2 est de produire des mutations dans une molécule d'ARN et d'observer sa croissance à 18°C ainsi qu'à 30°C (Zavanelli et al., 1994). À faible température, les interactions entre les molécules deviennent plus stables. Donc si une ou plusieurs mutations provoque une consolidation de certaines liaisons qui doivent être dynamiques, on devrait observer un arrêt ou un ralentissement de la croissance des cellules à 18°C, comparativement à 30°C, où l'on devrait constater une croissance tout à

fait normale (Zavanelli et al., 1994). Afin d'observer une sénescence rapide à 18°C, nous avons délété un autre gène, soit *YKU70*. La double délétion de *tlc1Δ* et *Yku70Δ* provoque une sénescence plus rapide des cellules que le double mutant *tlc1Δ rad52Δ*. En effet, la délétion de *TLC1* ainsi qu'une des composantes du complexe YKu70/80, provoque la sénescence des cellules autour de 10-20 générations (Gravel et al., 1998) au lieu de 40-60 générations pour les souches *tlc1Δ rad52Δ* (Le et al., 1999).

Objectif spécifique

Afin de déterminer des éléments de la structure tertiaire ainsi que les interactions intramoléculaires critiques, la génération de mutants sensibles au froid peut contribuer à augmenter nos connaissances sur l'ARN de *TLC1*. Pour créer un bassin de mutants susceptibles d'être sensible à la température, j'ai mis au point une technique de mutagenèse qui permet d'obtenir un nombre de mutations adéquats. Après avoir créé la librairie de mutants, plusieurs milliers de clones ont pu être testés *in vivo*.

Matériel et méthodes

Souches et plasmides

Les souches utilisées pour le criblage de mutants sensibles au froid est dérivé du croisement de CSHY76 (*MAT α ade2 ura3 leu2 his3 trp1 tlc1 ::LEU2*) provenant du Dr. C. Greider (Le et al., 1999) et de KRY36-6L (*MAT α ade2(-1 or -101) ade8-18 ura3-52 trp1 Δ 1 leu2 Δ -RC his3 Δ 200 yku70 Δ ::HIS3*) donnant la souche NLE001 (*tlc1 ::LEU2 yku70 Δ ::HIS3*). Une double mutation *TLC1* et *HDF1* (ou *YKU70*) provoque la sénescence des cellules autour de 10-20 générations, rendant l'identification de mutants assez rapide (Gravel et al., 1998). Étant donné que la délétion de *YKU70* occasionne des télomères plus courts (Porter et al., 1996). De ce fait, la longueur des télomères des clones sensibles au froid a été observée dans la souche RWY12 (*MAT α ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1- Δ 63 his3- Δ 200 leu2- Δ 1 tlc1 ::LEU2*).

Dans cette étude, le plasmide pADCEN36, décrit dans le chapitre I, a été utilisé pour remplacer l'allèle endogène de *TLC1* et garder la souche NLE001 en vie. Le marqueur nutritionnel *URA3* sur le plasmide va permettre la réjection de celui-ci par passage sur milieu 5-FOA. Le plasmide qui va contenir l'allèle de *TLC1* mutée est pTLC1TRP. Ce plasmide est dérivé de pRS314 (Sikorski et Hieter, 1989) et contient le marqueur nutritionnel *TRP1* ainsi que *TLC1*. Des mutations ont été créées dans l'allèle de *TLC1* par PCR comme décrit plus bas.

Mutagenèse par PCR et dITP

L'intégration de mutations dans l'allèle de *TLC1* s'est fait par l'introduction de dITP (désoxyinosine triphosphate) par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Modifié de (Spee et al., 1993)). Les molécules dITP peuvent être introduites de façon aléatoire durant la réaction de PCR. Lors d'une seconde ronde de synthèse, n'importe quel nucléotide peut être incorporé à l'opposé du dITP. On obtient alors des bases complètement différentes de la séquence initiale. Afin d'augmenter le taux de mutagenèse, plusieurs rondes de PCR incluant des dITP ont été fait et la concentration de Magnésium (Mg) a été modifiée et du Manganèse (Mn) a été ajouté. Voici les différentes étapes effectuées afin d'avoir suffisamment de mutations pour le criblage.

- A -Première ronde de PCR. Le PCR a été effectué avec les amorces 5'CTTCCTCTTTAGCAATGGTGAC3' et 5'AACCGAATTCGGGAAGGTAAATACC-ACC3' avec 10 mM de dITP, 6 mM de MgCl₂, 0,3 mM de MnCl₂, 12 µM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 1/10 volume du tampon 10X sans MgCl₂ fourni par la compagnie (500 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.3) et 2U de Fast Start Taq (Roche). Afin d'augmenter l'efficacité de mutagenèse, la diminution de la concentration d'un nucléotide est recommandé. Dans notre cas, nous avons opté pour les dATPs étant donné que l'ARN de *TLC1* est riche en A et T. Le programme du PCR comporte les étapes suivantes : 94°C durant 2 min, puis 94°C :30sec, 51°C :30 sec, 72°C :1,30 min répété 20 à 25 fois, terminé par 4 min à 72°C.

- B -Deuxième ronde de PCR. Le produit de PCR obtenu en (A) a été purifié sur gel d'agarose 1% et l'ADN a été extrait à l'aide de colonnes d'extraction de gel (Qiagen). Le 2^e PCR a été fait avec une amorce située plus à l'intérieur du gène que l'autre précédemment 5'CTTCCTCTTTAGCAATGGTGAC3' et 5'ATTTGTATATTGTATATTC-TAAAAAGAAGAAGCC3'. Les conditions de ce PCR sont les mêmes que décrit par la compagnie, c'est-à-dire avec 10 mM de chacun des dNTP et aucune trace de dITP ainsi que de MnCl₂.
- C -Troisième ronde de PCR. Ce PCR ressemble beaucoup à la première ronde de PCR sauf que le temps d'hybridation des amorces à 51°C durant la réaction de PCR est de 30 min au lieu de 30 sec!
- D -Quatrième ronde de PCR. Le produit de PCR obtenu en (C) a été purifié sur gel et la réaction de PCR a été performée comme en (C). Le nombre de mutations estimé à ce stade est d'environ 5 mutations/ kb.

Clonage et transformation dans les bactéries

Les produits de PCR obtenu en (D) ainsi que le plasmide pTLC1TRP ont été digérés par les enzymes *Stu*I et *Nsi*I (NEB) utilisant les tampons fournis et conditions décrit par la compagnie. Les fragments désirés ont été purifiés sur gel d'agarose 1% et l'ADN a été extrait à l'aide de colonnes d'extraction de gel (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les produits de PCR digérés ont été ligués dans le plasmide pTLC1TRP, digéré avec les mêmes enzymes, à l'aide de la T4 ligase. Cette enzyme est produite sur le département de Microbiologie et d'Infectiologie par Catherine Desrosiers en utilisant le plasmide pUV5-

G1S. Ces préparations ont démontré une plus grande efficacité qu'une enzyme produit commercialement (données non-montrées). La réaction de ligation contenant 150 ng d'ADN du vecteur, 50 ng d'ADN d'insert, 1 μ L de tampon de ligase (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 25 μ g/ml BSA), 400U de ligase dans un volume final de 10 μ L a été incubé à 23°C durant 24h. Le produit de ligation est ensuite transformé dans des cellules bactériennes (DH5 α) chimiocompétentes préparées selon (Inoue et al., 1990). Brièvement, les cellules sont cultivées à 23°C dans 250 mL de SOB (0,5% yeast extract, 2% tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$) jusqu'à ce que la culture atteigne une D.O. _{600nm} entre 0,4-0,6. Les cellules sont ensuite refroidies sur glace 10 min et centrifugées à 4000 x g 10 min à 4°C. Le culot est lavé avec 80 mL de TB froid (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, pH 6.7). Les cellules sont encore centrifugées à 4000 x g 10 min à 4°C puis resuspendues dans 5 mL de TB contenant 350 μ L de DMSO froid. Les produits de ligation sont transformés dans les cellules selon (Sambrook et al., 1989). Sommairement, 1 μ L de ligation est ajouté à 100 μ L de bactéries et laissé sur glace pour 30 min. Ensuite, les cellules sont mises à 42°C pour 2 min, sur glace pour 2 min et 900 μ L de LB (Sambrook et al., 1989) est ajouté. Par la suite, les cellules sont incubées 20 min à 37°C et étendues sur des pétris LB contenant 1 μ g/ μ l d'ampiciline. Le nombre de transformants nécessaires évalué pour qu'avec 5 mutations/ kb on puisse couvrir au moins une fois chaque nucléotide est de 20 000.

Minipréparation d'ADN plasmidique de bactéries

L'isolation d'ADN plasmidique des bactéries a été effectuée par méthode de colonnes (Qiagen). L'extraction a été effectuée selon le manufacturier.

Transformation et criblage de la librairie de mutants

La librairie de clones mutants est transformée dans la souche NLE001 par la méthode très efficace à l'acétate de lithium (Gietz et al., 1995). Le nombre de transformants obtenus a été considéré en fonction du nombre de mutants obtenus lors de la ligation, soit 20 000. Les levures transformées (NLE001) contenaient déjà le plasmide pADCEN36 afin de maintenir la croissance des cellules. Après introduction des plasmides pTLC1TRP possédant les allèles de TLC1 mutés aléatoirement, les cellules ont été mis sur milieu YC-trp à 30°C (Sambrook et al., 1989) pour garder le nouveau plasmide. Puis, les cellules ont été répliquées par la méthode du velours sur milieu 5-FOA-trp afin de se départir du plasmide pADCEN36 contenant l'allèle de type sauvage de *TLC1* et de garder pTLC1TRP. La technique de répliqua de velours consiste à prendre un pétri qu'on presse sur un velours afin de laisser une certaine quantité de cellules. Puis, avec un nouveau pétri, il est possible de récupérer un certain nombre de ces cellules juste par pression. Les répliqua ont donc été fait sur 2 pétris 5-FOA-trp dont un à été mis à 18°C et l'autre à 30°C afin de vérifier la thermosensibilité des mutants (Figure 15).

Croissance par dilution en série (spot tests)

Les cellules ont été poussées en milieu liquide sélectif à 30°C pour qu'elles atteignent une D.O. _{660nm} entre 0,6 et 1,0. Des dilutions en série sont ensuite effectuées (dilutions successives 1/10) et 3 µl ont été déposés sur milieu sélectif approprié. Les dilutions sont effectuées de façon à ce que entre les différents points disposés sur les pétris, on retrouve 10 à 10 000 cellules.

Préparation de l'ADN et analyse de la longueur des télomères

Les clones sensibles au froid ont été transformés dans la souche RWY12. L'extraction de l'ADN génomique ainsi que l'analyse de la longueur des télomères a été faite comme décrit précédemment (Matériels et méthodes, Chapitre I).

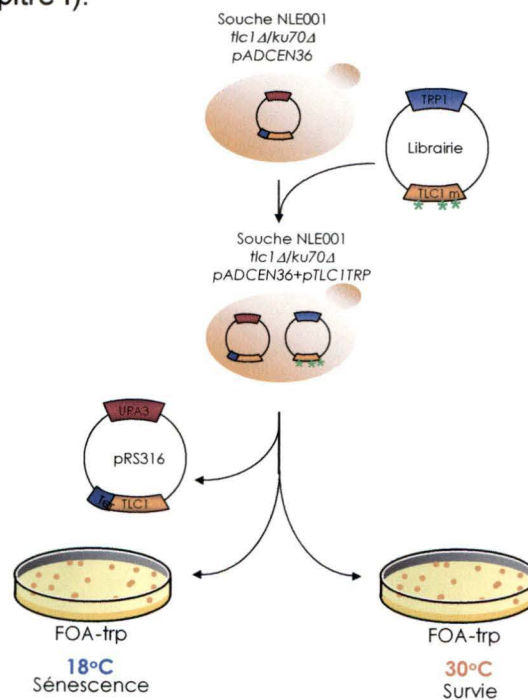


Figure 15. Schéma du criblage des mutants sensibles au froid. Les cellules haploïdes ayant la délétion pour *tlc1Δ* et *Yku70Δ* contiennent le plasmide *pADCEN36* (*TLC1*, *URA3*). La plasmide avec le gène *TLC1* muté est ensuite transformé et mis les cellules sur milieu YC-trp. Les colonies obtenues sont par la suite répliquées sur milieu FOA-trp à 18°C et à 30°C pour s'assurer de la perte du plasmide *pADCEN36*. Les mutants recherchés devraient sénescer à 18°C tandis que celles à 30°C devraient survivre.

Résultats

Création d'une librairie de mutants. Afin d'étudier la structure tridimensionnelle de l'ARN de la télomérase, la création d'un criblage de mutants sensibles au froid peut être un moyen efficace d'élargir nos connaissances sur les possibles interactions intramoléculaires. En effet, ce type de criblage a déjà su faire ses preuves avec d'autres ARNs tel U2 (Zavanelli et al., 1994). Cependant, l'ARN de TLC1, contrairement à U2, est considérablement plus grand, faisant en sorte que la structure peut être beaucoup plus flexible. De ce fait, un nombre plutôt élevé de mutations doivent être inséré dans l'ARN afin d'être en mesure de visualiser un phénotype de thermosensibilité. Plusieurs méthodes de mutagénèse ont été testées pour effectuer des mutations dans *TLC1*. Cependant, la plupart des méthodes expérimentées ont données un nombre insuffisant de mutations (Tableau 4). La méthode de mutagénèse par PCR incluant des dITP s'est avérée à être la plus prometteuse. Pour cette méthode, une première ronde de PCR a été effectuée avec des dITP (A : voir Matériel et Méthode). La deuxième ronde de PCR doit ensuite se faire sans dITP afin de permettre l'incorporation de n'importe quel autre nucléotide à la place

Méthode de mutagénèse	Mut/kb
Bactéries XL1-Red ¹	1,2
Chimique (Hydroxylamide) ²	2
PCR + dITP ³	5

¹(Greener et Callahan., 1994) ²(Freese et al., 1961) ³(Spee et al., 1993)

Tableau 4. Fréquences de mutations à l'ADN avec différentes méthodes de mutagénèse.

des dITP. Par contre, ce type de PCR est très difficile à rendre efficace et plusieurs stratégies ont été essayées afin d'obtenir des bandes lors du PCR. Donc, en premier lieu pour obtenir un produit de PCR satisfaisant, le produit initial a été purifié sur gel afin de se débarrasser des dITP ainsi que des produits de PCR intermédiaires. De plus, l'utilisation d'amorces plus à l'intérieur du gène a nettement amélioré l'efficacité du PCR (B) (Figure 16). Afin d'augmenter d'avantage le nombre de mutations, une deuxième ronde de PCR avec des dITP (3^e ronde de PCR au total) a été effectuée. Par contre, cette fois le fait de prendre une amorce plus vers l'intérieur du gène n'a pas su donner des résultats satisfaisants. La méthode qui s'est avérée la plus efficace, pour des raisons encore inconnues, a été d'effectuer un temps d'hybridation durant la réaction de PCR de 30 min au lieu de 30 sec (Figure 17A). Finalement, une deuxième ronde de PCR sans dITP (4^e ronde de PCR au total) a été effectuée et encore une fois le produit de PCR précédent a été purifié sur gel et le PCR subséquent a été fait avec un temps d'hybridation très long (D). Une troisième ronde de PCR

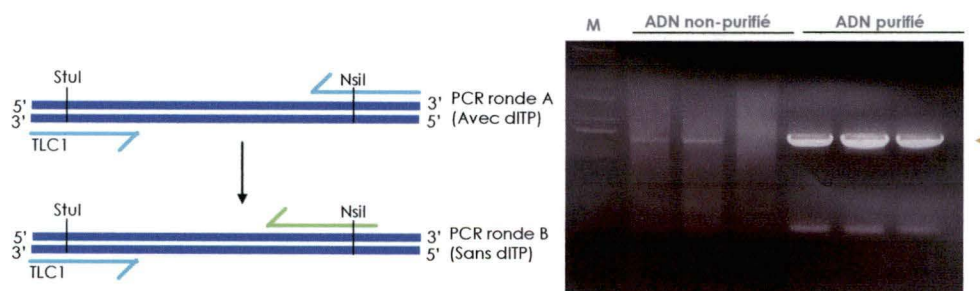


Figure 16. Fragments d'ADN amplifiés lors de la deuxième ronde de PCR (sans dITP). Afin d'obtenir un produit de PCR une amorce plus à l'intérieur du gène a été utilisée. La purification du produit de PCR de la réaction précédente améliore de façon significative l'efficacité de la réaction de PCR subséquente (Voir Matériel et méthode section B).

avec des dITP (5^e ronde de PCR au total) a été essayée, mais jamais nous n'avons pu obtenir des bandes à la taille désirée (Figure 17B). Après deux rondes de PCR avec des dITP, le taux de mutations a été estimé par séquençage à 5 mutations/ kb. Ces produits de PCR ont ensuite été clonés dans le plasmide pTLC1TRP puis transformés dans des bactéries pour l'amplification des clones. Les clones ont été produits en bactéries dont l'ADN plasmidique a été extrait et transformé dans les cellules de levure afin de procéder au criblage.

Isolation de mutants sensibles au froid. Après avoir transformé tous les clones dans la souche de levure, les colonies ont été répliquées sur milieu FOA de façon à se débarrasser de l'allèle de type sauvage de *TLC1* et placées à 18°C et 30°C (voir Matériels et méthodes). Les cellules contenant le gène de *TLC1* de type sauvage poussées sur milieu YC-trp sont en mesure de pousser à 18°C et 30°C (données non montrées). Par ailleurs, les cellules en absence de *TLC1*, sont incapables de croître 18°C mais aussi à 30°C (données non montrées). Des 20 000 clones, 93 ont été

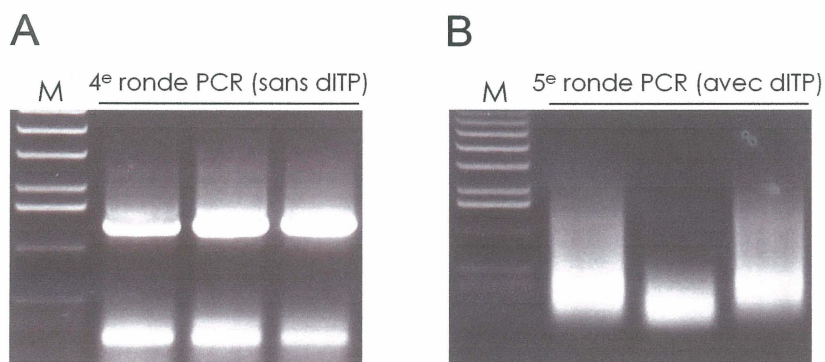


Figure 17. Résultats des rondes d'amplification par PCR. (A) Amplification de *TLC1* par PCR avec un temps d'hybridation de 30 min au lieu de 30 sec. (B) Incapacité d'effectuer une 5^e ronde de mutagenèse par PCR. Le changement d'amorces, la purification du produit de PCR sur gel ainsi que l'augmentation du temps d'hybridation n'améliore en rien l'amplification.

restreintes sur milieu FOA-trp afin d'éliminer les faux-positifs, c'est-à-dire les cellules qui auraient poussées à 30°C et non à 18°C car elles auraient été mal répliquées et non parce qu'elles étaient thermosensibles (Figure 18A). Dans un même but, nous avons aussi étalé un nombre décroissant de cellules par dilution en série (Figure 18B). Le striage des cellules nous donne l'occasion d'observer l'aspect général de la croissance des colonies, tandis que la croissance par dilution en série nous permet d'observer le nombre de colonies qui sont en mesure de pousser. De plus,

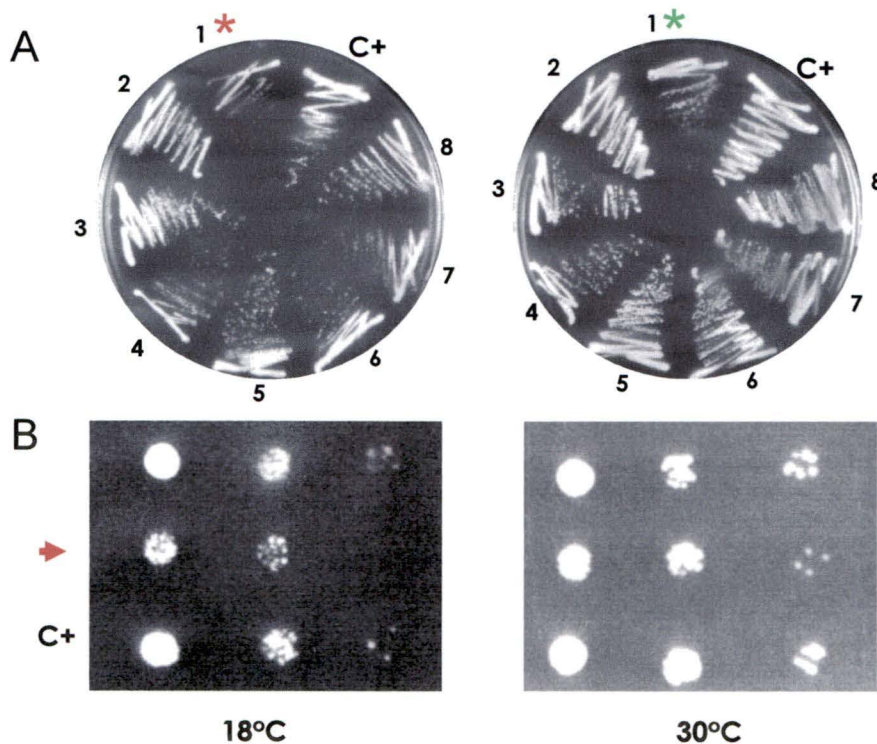


Figure 18. Isolation de mutants sensibles au froid. Isolation de clones qui, lors du premier criblage (20 000), semblaient démontrer un phénotype de thermosensibilité. (A) Sur le pétri de gauche, les cellules ont été poussées à 18°C, tandis qu'à droite, les cellules ont été poussées à 30°C. * : indique la position d'un seul mutant sensible au froid sur ce pétri. C+ : contrôle positif (cellules contenant le gène *TLC1* de type sauvage). Le striage des cellules permet de discriminer les faux-positifs du premier criblage. (B) Croissance par dilution en série (spot tests). Dilutions de cellules poussées à 18°C (à gauche) et à 30°C (à droite). La flèche indique un mutant sensible au froid. Les autres clones sont des faux positifs parmi les 93 clones isolés lors du premier criblage. C+ : contrôle positif (*TLC1* de type sauvage).

un contrôle positif, c'est-à-dire des cellules qui contiennent la version de type sauvage de *TLC1*, a été utilisé. Celui-ci nous donne un point de référence pour identifier les mutants qui ont plus de difficulté à pousser à 18°C par rapport à 30°C. En plus des différentes méthodes d'isolation, le contrôle nous facilite alors l'isolation des mutants sensibles au froid. Du nombre de 93, 10 ont finalement présentées un réel phénotype de thermosensibilité (faible croissance, très petites colonies). Afin de bien évaluer la thermosensibilité des clones, nous les avons restriés sur des pétris pour nous permettre de mieux observer la croissance des cellules.

Afin de vérifier que les différents clones thermosensibles affectent la fonction de *TLC1*, nous avons décidé d'analyser la longueur des télomères dans une souche délétée de l'ARN *TLC1* de type sauvage (RWY12). Les souches contenant les clones sensibles au froid ont été poussés à 18°C et 30°C, et ce, jusqu'à 100G. Nous avons donc observé la tailles des télomères des ces souches à 20G et 100G (Figure 19) et ce, pour deux clones indépendants (données non montrées). Les clones 1, 2, 3, 10 (donnés non montrés), 7 et 9, ont des TRFs de la même taille que le contrôle positif. Par contre, chez les clones 4, 5, 6 et 8, on observe que la taille des télomères semble varier. En effet, la tailles des télomères de ces clones poussés à 18°C apparaît plus longue que ceux poussés à 30°C. Cette très faible différence de taille entre les deux températures est observée autant à 20G qu'à 100G. De plus, le même phénotype est observé pour les deux clones indépendants (données non montrées).

Nous nous sommes ensuite questionné sur la répartition des mutations des clones sensibles au froid. En effet, nous voulions savoir s'il y avait une corrélation entre la différence de la taille des télomères et la localisation des mutations. Les mutations déterminées par séquençage nous montrent dans un premier temps qu'elles se retrouvent dans les mêmes régions (tige II, IV et VII) (Figure 20). De plus, les clones 4, 5, 6 et 8, qui semblent générer un phénotype télomérique, ont des mutations dans une régions très précise au niveau de la tige-boucle IId. Dans un même ordre d'idée, les clones 2 et 10, qui ne présentent aucun phénotype télomérique, ne possèdent d'ailleurs aucune mutation selon les données de séquençage. Le séquençage de clones générés par PCR (positifs ou négatifs), démontre que la méthode de mutagenèse introduit des mutations de façon aléatoire, sans site préférentiel (données non montrées).

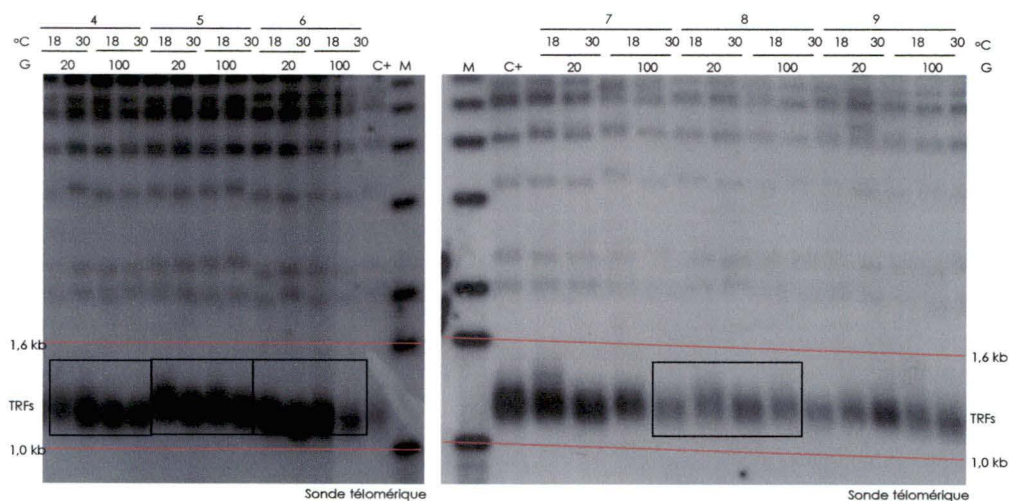


Figure 19. Longueur des TRFs des souches complémentées par les mutants sensibles au froid. L'ADN des souches *S. cerevisiae* délétées de *TLC1* comprenant un plasmide avec les différents mutants sensibles au froid de *TLC1*, digéré avec l'enzyme *XhoI* et migré sur gel 1% et hybridé avec une sonde télomérique. Piste M: Marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder, piste C+: contrôle positif. Les clones 4, 5, 6 et 8 démontrent un très faible phénotype télomérique. Les clones 7 et 9 ne présentent aucun phénotype télomérique.

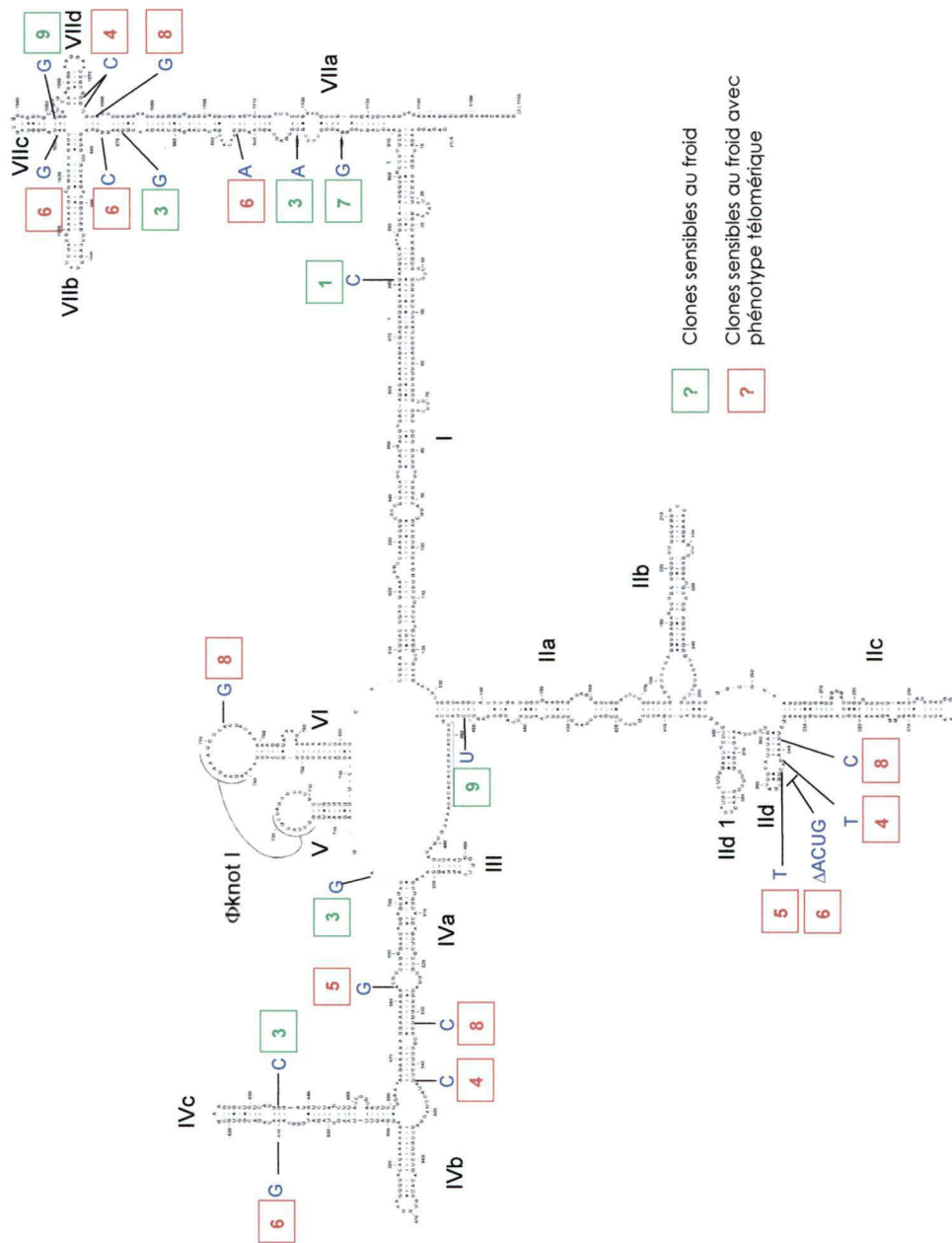


Figure 20. Mutations des clones sensibles au froid. Représentation des mutations pour les 10 clones sensibles au froid. Les changements de nucléotide sont indiqués par une flèche et le nouveau nucléotide est indiqué en bleu. Les clones en vert indiquent les mutants qui présentent un phénotype de thermosensibilité sans phénotype télomérique et ceux en rouge indiquent les mutants thermosensibles qui démontrent un phénotype télomérique.

Chapitre III

- **Développement d'une méthode de purification de la télomérase chez *S. cerevisiae* afin de découvrir de nouvelles composantes du complexe.**

Préambule

Plusieurs composantes de la télomérase de levure sont connues jusqu'à ce jour. Pourtant, sur cette énorme molécule d'ARN, plusieurs larges régions, dont les fonctions sont encore inconnues, n'ont aucune protéine associée connue. Nous supposons donc que ces régions peuvent servir de sites d'association pour d'autres protéines. Afin de découvrir d'autres composantes de cette télomérase, nous avons donc entrepris la purification de ce complexe. Dans le but de conserver les protéines dans leur état natif, nous avons délaissé l'ajout d'une étiquette d'affinité aux protéines pour cibler plutôt la composante ARN de la télomérase. En effet, l'ARN de la télomérase, en plus de jouer un rôle de matrice pour l'ajout de répétitions télomériques, occupe une fonction d'échafaudage pour l'assemblage de tous les constituants du complexe. Nous avons donc décidé d'insérer une étiquette ARN sur l'ARN de *TLC1*. Cette étiquette ARN, développé par SELEX dans le laboratoire du Dr D. Engelke, possède une très forte affinité pour la streptavidine, mais une affinité moins grande que la biotine. Cette dernière molécule peut donc être utilisée pour libérer l'ARN des billes de streptavidine tout en évitant de dénaturer le complexe (Figure 19).

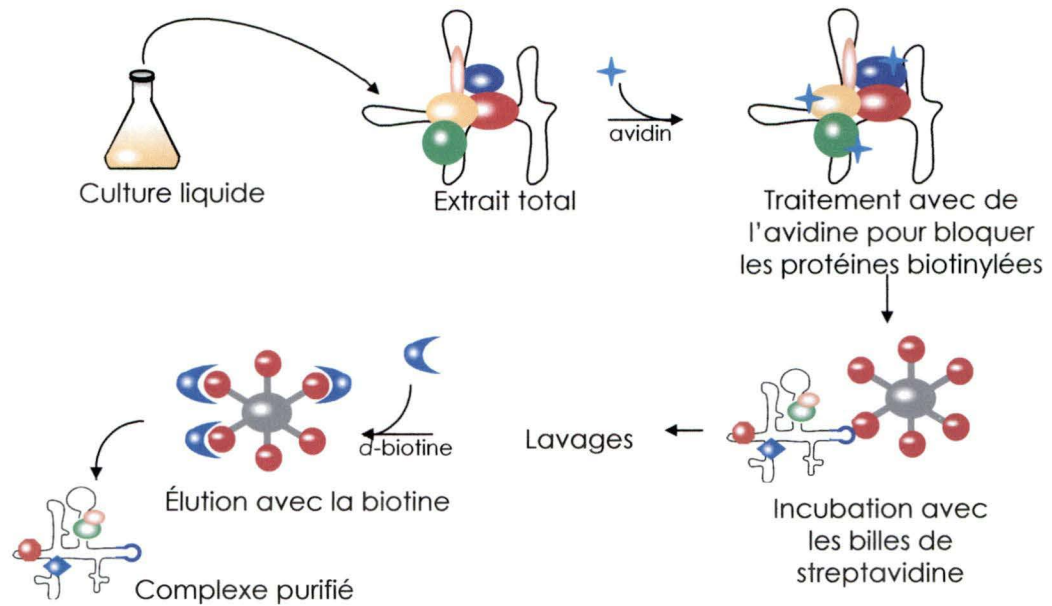


Figure 21. Schéma de la méthode de purification. Des extraits totaux sont produits à partir d'une culture liquide de cellules de levure. À cet extrait de l'avidine est ajouté bloquant les protéines biotinylées et la biotine libre de venir se lier de façon non spécifique aux billes. Le mélange est ensuite ajouté aux billes. Quelques lavages sont effectués afin d'éliminer le non-spécifique, puis la biotine est ajoutée afin de déplacer l'ARN des billes afin de recueillir les complexes purifiés.

Objectif spécifique

Dans le but de découvrir de nouvelles composantes de la télomérase de levure chez *S. cerevisiae* ainsi que d'améliorer nos connaissances sur la structure/fonction de la composante ARN de la télomérase, nous avons entrepris une nouvelle méthode de purification ciblant l'ARN. Pour cette expérience nous avons donc ajouté un aptamère à l'ARN de *TLC1* à deux endroits différents et tenté de mettre au point la technique de purification pour notre système.

Matériel et méthodes

Souche et plasmides

La souche utilisée pour la méthode de purification est CSHY76 (*MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 tlc1 ::LEU2*) contenant pADCEN58 ou pADCEN59. Le gène de TLC1 a été introduit dans la levure sur un plasmide pRS316 (Sikorski et Hieter, 1989). Deux constructions différentes de l'ARN avec l'étiquette 5'UGCUAGCUUUACCGACCAGAAUCAUGCAAGUGCGUA AGAUAGUCGCGGGCCGGGUUUUGCU3' introduit par PCR ont été produites par A. Dandjinou. Sur la construction pADCEN58, l'étiquette S1 se retrouve au bout de la tige-boucle IId, tandis que pour la construction pADCEN59, il se situe à l'extrémité de la tige-boucle VIIc (Figure 20). La souche contrôle JYL-1 (*MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3 trp1-1 ura3-1 rpr1::KanR*) contenant pRPR-S1 (Lee et al., 1991) a été fourni par D. Engelke. Le gène RPR1 avec l'étiquette S1 a été cloné dans le plasmide pRS315 et provient aussi de D. Engelke (Srisawat et Engelke, 2001).

Extraction de protéines natives des cellules de levure

Les protéines ont été extraites selon (Srisawat et Engelke, 2001). Pour les deux souches de levures (CSHY76 et JYL-1) des colonies ont été piquées et une culture liquide de 1L dans le milieu de culture approprié a été poussée à 30°C (pour la souche CSHY76, pousser dans milieu liquide YC-ura, tandis

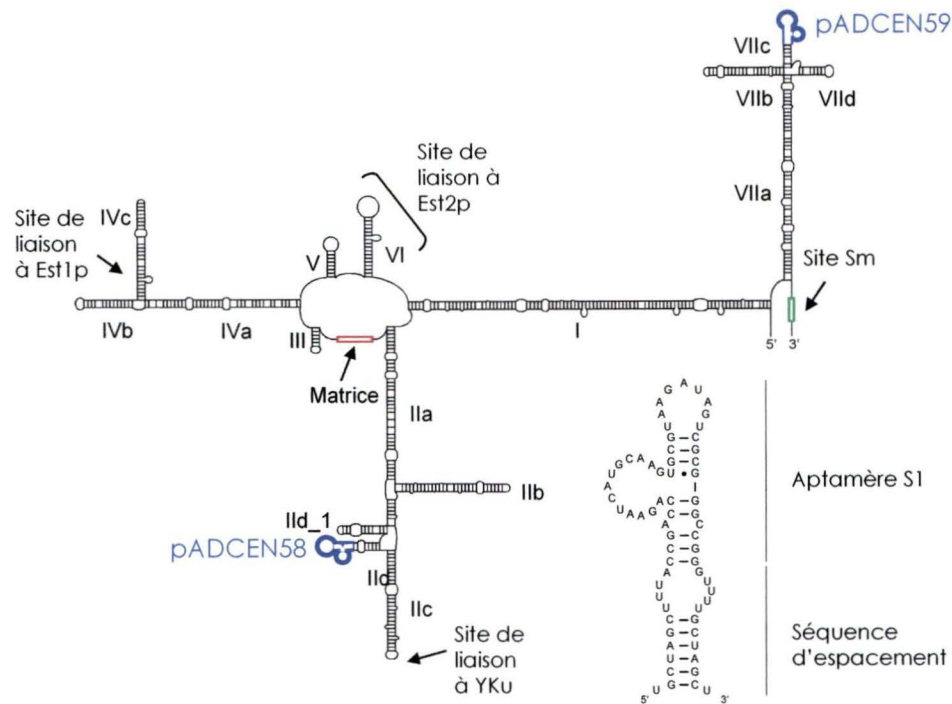


Figure 22. Schéma de l'insertion de l'étiquette ARN S1 à l'ARN de TLC1. Sur la construction pADCEN58 l'étiquette S1 se retrouve au bout de la tige-boucle IId, tandis que pour la construction pADCEN59, il se situe à l'extrémité de la tige-boucle VIIc. Une séquence d'espacement a été ajoutée à l'étiquette S1.

que pour la souche JYL-1, le milieu liquide YC-leu a été utilisé (Sambrook et al., 1989)). Les cellules ont été lavées deux fois avec de l'eau en centrifugeant à 4,000 x g à 4°C pour 5 min. Le culot final a été resuspendu dans un volume finale de 5 mL de tampon de lyse (50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% Triton-X 100, 10% glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) et de la RNasine (inhibiteur des RNases, Promega). Les cellules sont ensuite vortexées à la température de la pièce pendant 30 min avec 10g de billes de verres d'une grosseur de 425-600 µm (Sigma) lavées à l'acide. Chaque 2 min, les échantillons sont déposés sur la glace sèche afin de refroidir le lysat et le garder autour de 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé deux fois à 14 000 x g pour 5 min à 4°C. Le

surnageant est rapidement recueilli et mis à -80°C. La concentration de protéines a été déterminée par un essai Bradford (Bio-rad).

Méthode de purification du complexe

Le complexe de la télomérase chez *S. cerevisiae* a été purifié à l'aide de la l'étiquette ARN inspiré de (Srisawat et Engelke, 2001). Cependant certaines modifications ont été apportées afin d'améliorer l'efficacité de la technique. L'extrait cellulaire (d'une concentration variant entre 18-20 mg/ml) a été incubé avec de l'avidine (Sigma) pour une concentration de 5 µg d'avidin/mg de protéines pendant 10 min à 4°C. L'extrait est ensuite incubé avec un volume égal de billes streptavidine-agarose (Sigma) pendant 2-3h à 4°C avec une légère rotation. L'extrait est ensuite centrifugé à 13 000 x g pendant 1 min afin d'amener les billes dans le fond du tube pour ainsi enlever le surnageant. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec 1 volume de tampon de lyse pendant 10 min à 4°C chaque fois. L'élution du complexe a été effectué avec le tampon de lyse contenant 5 mM de *d*-biotine (Sigma) dans un volume de 40 µl pour chaque mg de protéines pendant 30 min-1h. La mixture est ensuite centrifugée 1min à 13 000 x g afin de recueillir le complexe. Les éluats sont rapidement conservés à -80°C.

Extraction d'ARN total des extraits cellulaires et transcrit d'ARN

Les extraits cellulaires ont d'abord été traités avec 1/10 volume de Protéïnase K à 10 mg/ml à 37°C pendant 10 min. Puis l'ARN total des

extraits cellulaire et éluats a été isolé grâce à deux traitements avec un volume égal de phénol-chloroforme, vortexé et centrifugé à 13 000 x g pendant 5 min à 4°C. Les échantillons ont ensuite été précipités avec de l'éthanol salé à 70% avec 5M LiCl. Puis, les extraits ont été traités à la DNase I (Amersham) suivant les instructions du manufacturier.

Des transcrits d'ARN contrôles ont été produits avec le Megascript T7 kit (Ambion). Un promoteur T7 a été introduit par PCR au début des gènes *TLC1* et *RPR1*. Une réaction type contenait 1 µg d'ADN (purifié sur gel, Qiagen), des ddNTP (7,5 mM chaque), mélange réactionnel de la compagnie (Ambion) et un mélange de diverses polymérases et les instructions ont été effectuées selon les spécifications du manufacturier (Ambion).

PCR quantitatif (Real-time PCR)

L'abondance de l'ARN avec et sans étiquette des échantillons provenant de chaque étape de purification est analysée afin de déterminer l'efficacité de la méthode. Tout d'abord une réaction de transcriptase inverse a été effectuée afin de transformer l'ARN désiré en ADNc. La réaction a été fait utilisant la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) en suivant les instructions du manufacturier. 1 µg d'ARN extrait a été utilisé dans cet essai avec des oligonucléotides spécifiques pour les gènes choisis (Tableau 5). Les amorces choisies possèdent une séquence non-spécifique à l'extrémité 5' (5'GATAAATAATGTGCCGGATCC3'), séquence qui sera utilisée ultérieurement pour le PCR quantitatif.

Dans le but de quantifier l'ADNc des réactions de transcription inverse, un PCR en temps réel a été réalisé (Applied Biosystem). L'ADNc a été dilué dans des ratios entre 1/8 et 1/20 et 4 µl ont été ajouté au tampon de réaction du PCR (50mM KCl, 5.5mM MgCl₂, 10 mM Tris pH8.0, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 400 µM dUTP, 50 nM ROX dye (Invitrogen), 0.25U UDG (NEB), 0.625U Taq ADN polymérase) et 1,25 µl de Taq Man (10 µl de chaque amorces (0,45 nM) et 10 µl de la sonde (0,125 nM) dans un volume final de 250 µl) (Amorces et sondes décrites dans le Tableau 5).

Northern Blot

Voir détails dans le Chapitre I. Les sondes utilisées dans ce cas-ci sont des ADNs radiomarqués spécifiques pour les locus des gènes *RPR1* et *TLC1*.

Oligonucléotides	Séquences 5'-3'
Primer TLC1 For RTP	CGAACGATGTGACAGAGAAA
Primer TLC1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTCAAATTACGTTCTTGATCTGTG
Primer SPT15 For RTP	AAACATGTGGCAACTGTGA
Primer SPT15 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCAATACGCATGATGACAGCAG
Primer RPR1 For RTP	TGTTCCGTTGACTTGTCTG
Primer RPR1 Rev RTP	GATAAATAATGTGCCGGATCCTGGAACAGCAGCAGTAATCG
Primer FLAP	GATAAATAATGTGCCGGATCC
Probe TLC1 RTP	CCCGCAAACCTAACCGATGCT (5' 6-FAM, 3' TAMRA)
Probe SPT15 RTP	TGCGCTACATGCCCCGTAATGC (5' 6-FAM, 3' TAMRA)
Probe RPR1 RTP	AGACCTTGACGCTCACGCCGT (5' 6-FAM, 3' TAMRA)

Tableau 5. Amorces et sondes utilisées pour le PCR en temps réel.

Analyse de l'ARN par électrophorèse en capillaires sur puces

L'ARN extrait a été analysé sur un « RNA 6000 Nano LabChip » (Agilent Technologies). Les puces et les échantillons ont été préparés selon les instructions du manufacturier. La matrice de gel a été préparée en ajoutant 1 μ l de marqueur bleu à 65 μ l de gel et le mélange gel-marqueur a été filtré. Ensuite, 9 μ l de gel-marqueur ont été déposés dans les puits de la puce prévus à cet effet. 5 μ L de « RNA 6000 Nano marker » a été ajouté aux puits prévus pour les échantillons et pour l'échelle de poids moléculaire. Puis, 1 μ l de marqueur de poids moléculaire et 1 μ l d'ARN à analyser dénaturé (50-100ng) sont ajoutés dans les puits correspondants. La puce a été vortexée et placé dans le « Agilent 2100 Bioanalyzer ». La détection quantitative de l'ARN est illustrée par un électrophorégramme convertie en une image de gel virtuel.

Résultats

Les ARNs de TLC1 avec l'étiquette S1 sont fonctionnels. Afin de découvrir des nouveaux partenaires du complexe de la télomérase, une étiquette ARN ayant de l'affinité pour la streptavidine a été ajoutée sur l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*. Les ligands de streptavidine ont été introduits par Alain Dandjinou aux extrémités de tige-boucles (IId et VIIc, Figure 20), régions où encore aucune protéine n'a été identifiée pour les lier, suggérant ainsi la disponibilité de l'étiquette. L'insertion de l'étiquette ARN à l'extrémité des tiges-boucles a été effectuée dans le but d'augmenter les chances d'exposition de celui-ci hors du complexe. De plus, une séquence d'espacement a aussi été ajoutée entre l'étiquette et l'ARN de *TLC1* exposant ainsi plus amplement l'aptamère hors du complexe. Une analyse par programme informatique a été réalisée afin de s'assurer que l'étiquette ainsi que la séquence d'espacement, n'affectaient en rien la structure secondaire de l'ARN. Par ailleurs, des tests de complémentation des deux différents clones des ARNs avec étiquette ont été produits de même que l'observation de la longueur des télomères dans une souche délétée pour *TLC1* et *RAD52* afin de s'assurer de la fonctionnalité des ARNs modifiés (clones pADCEN58 et pADCEN59) (travaux effectués par Alain Danjinou).

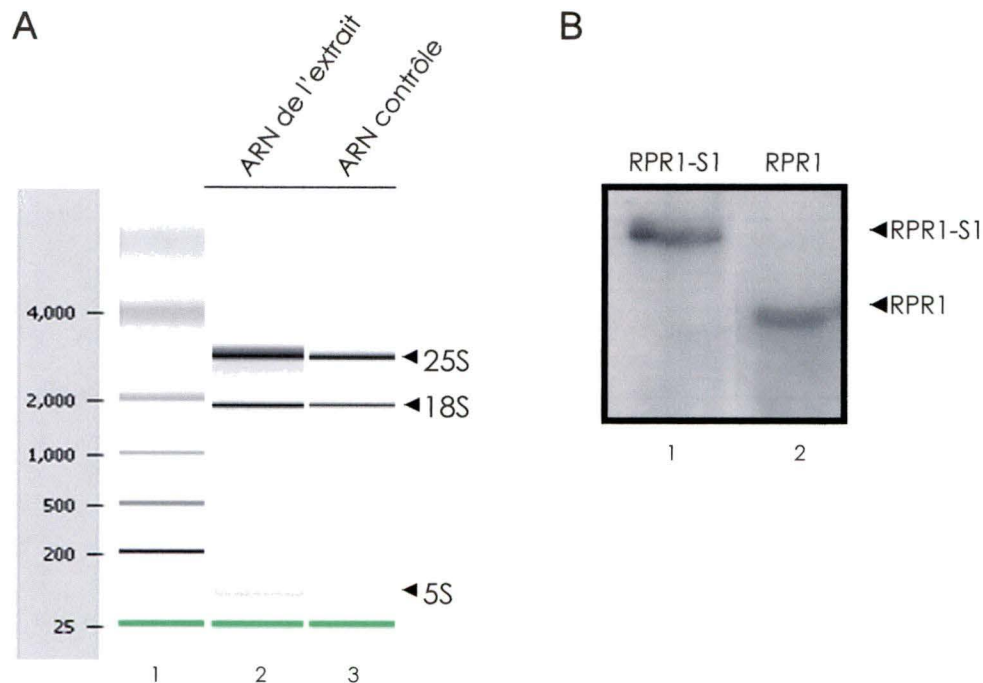
L'ARN des extraits cellulaires n'est pas dégradé. Lors de l'extraction du complexe, il est primordial de minimiser la dégradation de l'ARN par les diverses nucléases. Afin d'éviter la perte de protéines ou ARNs, diverses

précautions sont appliquées telles l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et de RNase et toutes les étapes d'extraction sont effectuées à 4°C. Bien que plusieurs dispositions soient prises, il se peut cependant qu'on assiste à une dégradation. En effet, plusieurs protocoles ont été essayés, mais nous n'avons gardé que celui qui donnait les meilleurs résultats (donnés non-montrées). Donc, afin de s'assurer que les extraits cellulaires sont en bonne condition nous avons entrepris de vérifier la qualité de l'ARN qui est d'autant plus importante pour la purification car le complexe est repêché grâce à la composante ARN du complexe.

Dans un premier temps, nous avons donc observé la qualité de l'ARN total d'un extrait cellulaire. Cet ARN a été comparé avec un ARN total provenant d'une autre méthode d'extraction d'ARN directe (Voir Matériel et méthode du Chapitre I) donnant de l'ARN de bonne qualité, nous servant de contrôle. L'analyse de l'ARN total a été effectuée à l'aide d'un bioanalyseur (Figure 21A). Dans la deuxième piste, se retrouve l'ARN contrôle et on peut distinguer l'ARNr 25S, 18S et 5S plus bas. Pour ce qui est de l'ARN provenant de l'extrait cellulaire, dans la première piste, on observe les mêmes bandes mais avec une très légère dégradation. Par ailleurs, l'abondance de l'ARNr 25S sur 18 S présente un ratio autour de 2 :1, démontrant encore une fois que l'extraction cellulaire est excellente (Sambrook et al., 1989).

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si l'aptamère S1 était toujours sur l'ARN avec l'étiquette après l'extraction cellulaire. En effet, celui-ci pourrait être enlevé par diverses nucléases lors de processus de

maturation de l'ARN. Donc, nous avons comparé l'ARN avec et sans étiquette provenant d'une extraction cellulaire par Northern blot hybridé avec une sonde composé du locus de RPR1 (Figure 21B). Les résultats démontrent que l'aptamère S1 est toujours sur l'ARN même après extraction (Piste 1, Figure 21B) si on compare avec le contrôle (ARN sans étiquette) (Piste 2, Figure 21B). De plus, les bandes observées sur le gel sont plutôt franches, proposant une absence de dégradation de l'ARN analysé. Ce résultat vient confirmer, encore une fois, que les extraits cellulaires sont de bonne qualité. Cette même expérience n'a pas été effectuée avec l'ARN de *TLC1* avec et sans étiquette dû à sa très grande taille. En effet, la faible résolution du gel de polyacrylamide ne permettrait pas d'observer la présence ou l'absence de l'étiquette S1 (60 nt) sur cet ARN.



Mise au point des conditions pour le PCR quantitatif. Afin de vérifier l'efficacité de la méthode de purification, nous avons décidé de suivre la présence de l'ARN avec l'étiquette à chaque étape de purification et ce, par PCR en temps réel. Dans le but d'éviter la saturation dans la réaction de PCR quantitatif, une optimisation de la quantité d'ADNc ajouté au PCR a été effectuée. Des dilutions des produits de réaction de transcription inverse ont été effectuées entre 1 et 1/50 volume, déterminant celles entre 1/8 et 1/20 comme étant adéquate pour avoir un signal spécifique (Figure 22).

Par ailleurs, afin d'évaluer la concentration de l'ARN avec l'étiquette (*TLC1* et *RPR1*) à chaque étape de purification, une courbe standard a été réalisé. En effet, un transcrit de l'ARN avec l'étiquette a été produit et dosé, puis différents PCRs quantitatifs ont été faite avec différentes dilutions de cet ARN. L'équation de la courbe standard permet ainsi de calculer la concentration de l'ARN d'un extrait avec une valeur de Ct spécifique (Ct :cycle threshold; nombre de cycles de PCR pour avoir une amplification).

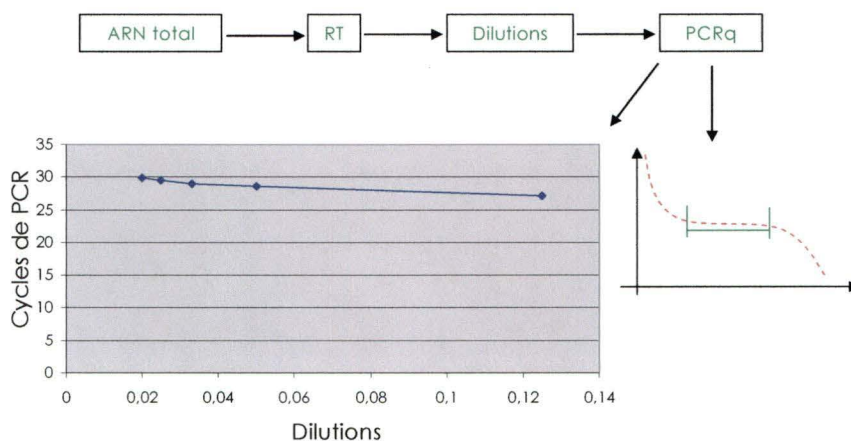


Figure 24. Dilutions de la réaction de la transcription inverse. Des dilutions de l'ADNc obtenu par réaction de transcription inverse ont été effectuée afin d'obtenir un signal approprié. Ces dilutions sont ensuite analysées par PCR quantitatif. Des dilutions passant de 1 à 1/50 ont été effectuées.

Les billes de streptavidine ont la capacité de lier l'aptamère S1. Les premiers tests de purification effectués avec le protocole original (Srisawat et Engelke, 2001) démontraient un taux d'enrichissement de l'ARN dans l'éluat autour de 1% (données non montrées). Face à ce résultat, nous nous sommes alors questionné sur la qualité des billes et sur la capacité de l'étiquette ARN S1 à lier les billes de streptavidine. Nous avons donc marqué radioactivement en 5' l'aptamère S1 (100 000 cpm) (Voir Matériels et méthodes Chapitre I) et effectué toutes les étapes de purification avec différentes concentrations de l'ARN non-marqué (50 µg, 20 µg, 1 µg et 0,5 µg) mais sans autre ARN ou protéines. Les résultats démontrent que les billes étaient en mesure de lier entre 38% et 75% de l'étiquette ARN S1 (Tableau 6) Par ailleurs, on constate que la diminution de la quantité d'ARN froid ajouté permet l'augmentation de liaison de l'ARN chaud (radiomarqué) aux billes. Nous étions alors sûr que l'ARN avait la capacité d'interagir avec les billes de streptavidine. Nous nous sommes donc demandé si il y avait

Fractions	ARN marqué dans chaque fraction (%)			
	Qté d'ARN non-marqué			
	50 µg	20 µg	1 µg	0,5 µg
Total	100	100	100	100
Non-lié	35,8	19,9	20,4	14,9
Lavage	34,2	18,2	10,8	9,5
Éluat	31	53,4	63,1	52,3
Billes	5,2	9,4	10,9	13,4
Éluat + Billes	38,3	66,2	77,1	75,7

Tableau 6. Analyse de la capacité des billes à lier l'étiquette ARN S1. L'aptamère S1 radiomarqué (100 000 cpm) a été mélangé à 50, 20, 1 ou 0,5 µg de l'étiquette non-radiomarqué pour effectuer un test de liaison avec les billes. Des fractions de chaque étape de purification ont été analysées. La liaison de l'étiquette avec les billes passe de 38% à 75%.

quelque chose dans l'extrait qui pouvait venir empêcher la liaison de l'apatamère S1 avec les billes. Si l'hypothèse s'avère vraie, cela signifie que l'étiquette ne devrait plus être en mesure de lier les billes. Nous avons donc effectué un test de purification avec une grande quantité de l'étiquette S1 (10 μ g) ainsi que de l'extrait cellulaire (18 mg). Les fractions contenant le non-lié, l'éluat ainsi que ce qu'il reste sur les billes ont été observé sur gel polyacrylamide coloré au bleu de méthylène (Voir Matériel et méthode Chapitre I) (Figure 23). On peut clairement observer la présence de l'étiquette S1 dans l'éluat (Piste 3, Figure 23). Par contre, en ce qui concerne les pistes avec les fractions provenant du non-lié aux billes et ce qu'il reste sur les billes (Pistes 2 et 4, Figure 23), la qualité de l'image ne nous permet en aucun cas d'affirmer s'il y a présence de l'étiquette ARN dans ces fractions. Nous pouvons donc conclure hors de tout doute que la faible efficacité de récupération de l'ARN avec l'étiquette au niveau de l'éluat lors de la purification du complexe n'est pas limitée par la qualité des billes ou l'étiquette ARN.

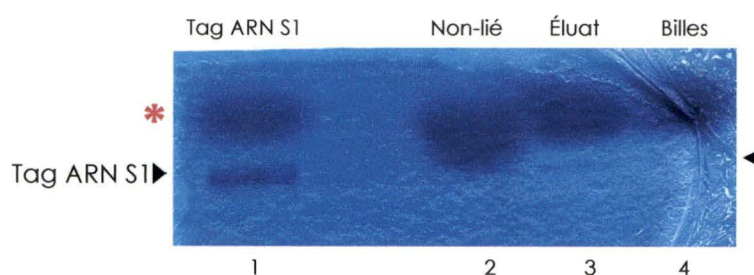


Figure 25. Analyse de la capacité de liaison de l'apatamère S1 aux billes en présence d'extrait cellulaire. L'étiquette ARN a été ajoutée à de l'extrait cellulaire qui a été soumis aux étapes de purification avec les billes. Les fractions des étapes de purification telles que le non-lié, l'éluat et le reste sur les billes ont été migrées sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de méthylène. Piste 1 : Étiquette ARN S1 (2 μ g), piste 2 : le non-lié, piste 3 : l'éluat, piste 4 : les billes (1/10 de la purification dans chaque piste). * : Marqueur/colorant bleu

La méthode de purification permet un enrichissement de l'ARN avec l'étiquette. La méthode de purification faite précédemment a démontré une efficacité de récupération de l'ARN avec l'étiquette très faible (~1%) (données non-montrées). Étant donné que le problème ne se retrouve pas au niveau des billes, de l'étiquette ou de l'extrait, nous nous sommes dit que le problème devait se trouver au niveau des étapes de purification. Nous avons premièrement essayé de mettre au point la technique avec l'ARN RPR1 avec l'étiquette qui a déjà été publié pour avoir une efficacité de récupération de 20 à 30% avec cette méthode (Srisawat et Engelke, 2002). Nous avons entrepris de répéter l'expérience afin de s'assurer que le problème de purification ne se retrouvait pas au niveau technique. Nous sommes alors entré en contact avec les auteurs afin de déterminer les éléments susceptibles de diminuer l'efficacité de la purification, pour finalement apprendre que l'enrichissement obtenu régulièrement est plutôt de 5 à 10% et les 20-30% seront plutôt exceptionnelles! Nous avons par la suite quand même tenté d'effectuer des modifications au protocole initial afin d'améliorer le rendement soit en augmentant la quantité de billes utilisée et le temps d'incubation avec les billes (Voir Matériel et méthode). Nous avons finalement réussi à atteindre un rendement autour de 23% lors de la purification avec l'ARN RPR1-S1 (Figure 24A). Les données de PCR quantitatif montrent clairement qu'une grande quantité d'ARN avec l'étiquette se retrouve dans l'éluat. Par contre, une certaine quantité semble être perdue dans le non-lié et très peu reste sur les billes à la fin. Afin de s'assurer de la spécificité de la purification, nous avons

suivi la présence d'un ARN sans étiquette (SPT15). Les résultats du PCR en temps réel démontrent que la purification est bel et bien spécifique pour l'ARN avec l'étiquette (Figure 24B). En effet, nous n'observons aucun signal SPT15 dans les fractions « Éluat » et « Billes ».

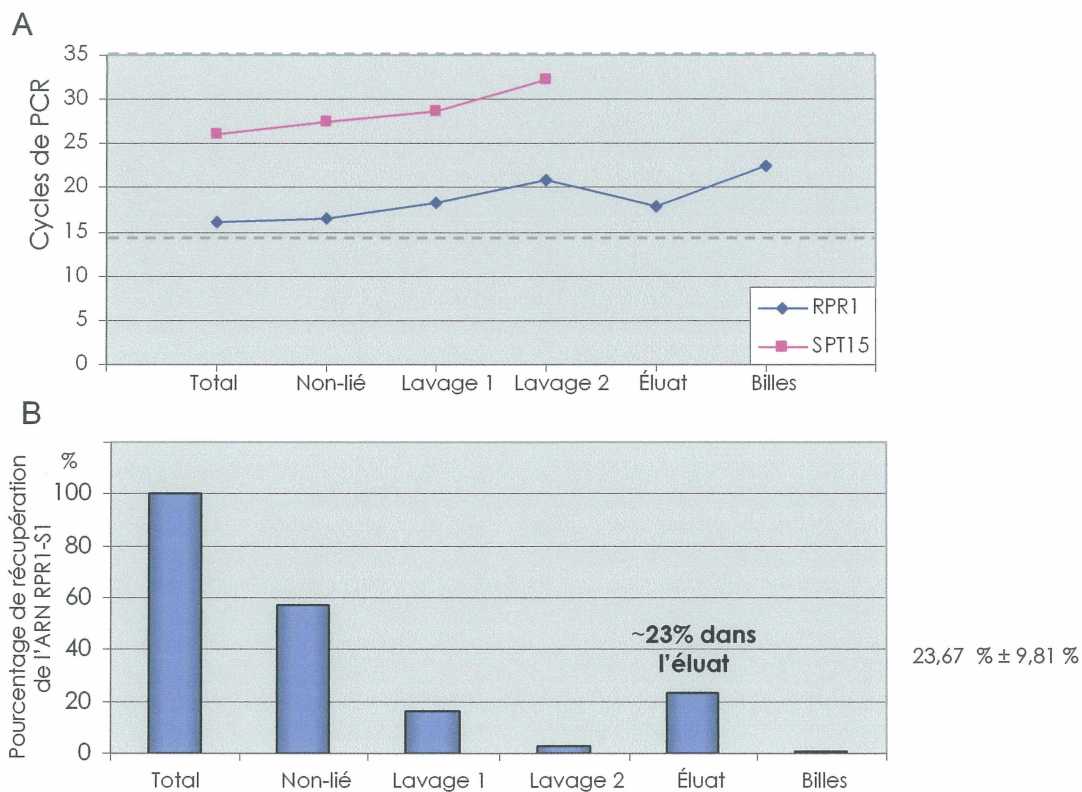
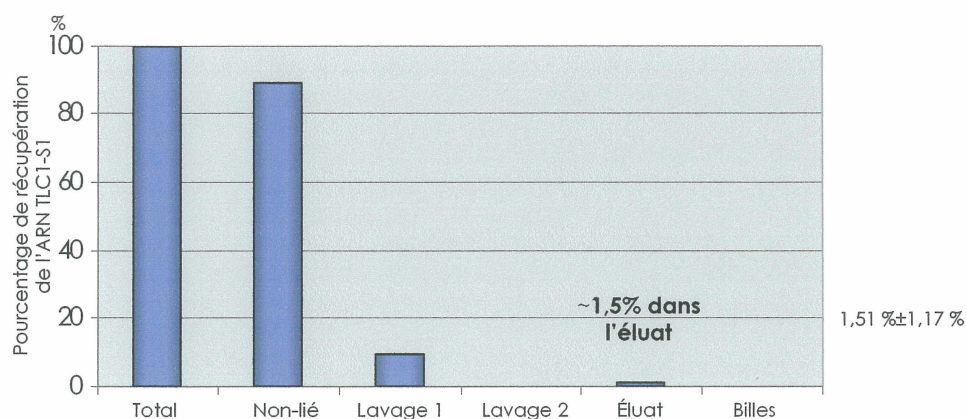


Figure 26. Analyse de la présence de l'ARN RPR1-S1 à chaque étape de purification. Un test de purification a été effectué avec l'ARN RPR1-S1. Des fractions à chaque étape de purification ont été recueillies et l'ARN a été extrait. Des réactions de transcription inverse ont été fait à partir de l'ARN suivi d'un PCR quantitatif. (A) Résultats du PCR quantitatif pour l'ARN RPR1 avec l'étiquette S1. Un ARN contrôle sans étiquette (SPT15) a été analysé afin de s'assurer de la spécificité de la purification. (B) Résultats en pourcentage (%) de la quantité d'ARN avec étiquette retrouvé à chaque étape de purification.

Étant donné que nous avons obtenu des résultats intéressants avec l'ARN RPR1-S1, nous avons donc débuté la purification de complexe de la télomérase avec les deux clones de l'ARN de *TLC1* avec l'étiquette intégrée. Le clone pADCEN59, présente un taux de récupération plutôt réduit, soit d'environ 1,5% (Figure 25A). Une grande partie de l'ARN avec l'étiquette

ser A



B

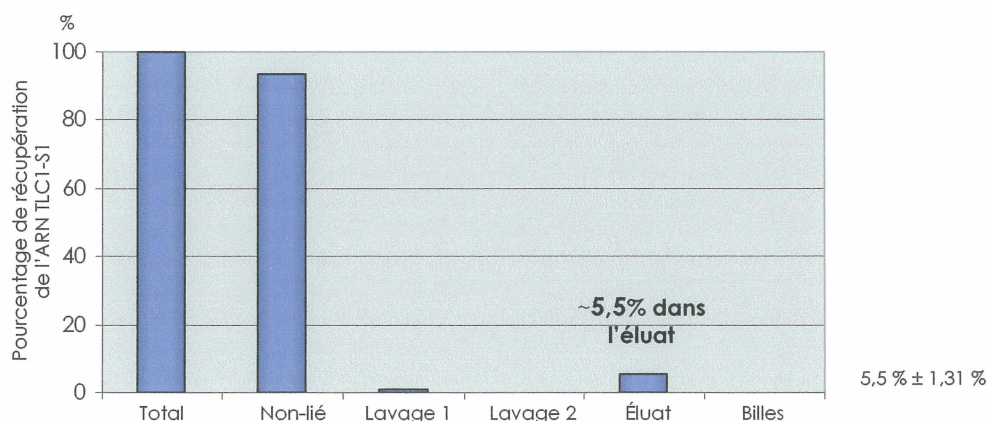


Figure 27. Analyse de la présence de l'ARN TLC1-S1 à chaque étape de purification. Un test de purification a été effectué avec l'ARN TLC1 avec l'étiquette S1. Des fractions à chaque étape de purification ont été recueillies et l'ARN a été extrait. Des réactions de transcription inverse ont été fait à partir de l'ARN suivi d'un PCR quantitatif. (A) Résultats en pourcentage (%) de la quantité d'ARN TLC1-S1 du clone pADCEN59 retrouvé à chaque étape de purification (B) Résultats en pourcentage (%) de la quantité d'ARN TLC1-S1 du clone pADCEN58 retrouvé à chaque étape de purification.

perdu dans le non-lié et les lavages. En ce qui concerne la construction pADCEN58, le taux de récupération est légèrement plus efficace soit de 5,5% (Figure 25B). Par contre, cette valeur est considérablement inférieure à celle obtenue pour l'ARN RPR1-S1.

VI. Discussion et conclusions

Implication dans la détermination de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*.

Afin de déterminer un modèle pour la structure secondaire de l'ARN de *TLC1*, on devait tout d'abord identifier des homologues de l'ARN pour être en mesure d'effectuer une analyse phylogénétique. Dans un premier temps nous avons vérifié par Northern blot que les gènes isolés étaient bel et bien exprimés dans la levure. Les résultats nous ont révélé que pour chaque espèce, le gène homologue était exprimé. En effet, une bande majeure pour les différentes espèces se retrouve approximativement à la même hauteur que celle pour la souche *S. cerevisiae* S288C. Cette bande majeure pour *TLC1* représente la forme mature de l'ARN, la forme poly (A)-. De plus, chez *S. cerevisiae* S288C et certaines autres espèces (*S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* et *S. bayanus*), apparaît une légère bande supérieure. Cette bande chez *S. cerevisiae* S288C se situe à la même hauteur que la forme poly (A)+ (Singer et Gottschling, 1994; Chapon et al., 1997; Seto et al., 1999). Par ailleurs, on pourrait imaginer que la bande mineure serait, aussi dans les autres cas, la forme poly (A)+. Cependant, aucune autre expérience n'a été effectuée afin de vérifier l'hypothèse.

Dans un deuxième temps, des tests de complémentations ont été effectués afin de vérifier la capacité des ARNs homologues à remplir les fonctions de *TLC1*. Cette étape est déterminante, car l'analyse

phylogénétique repose sur le fait que des ARNs qui ont des fonctions semblables devraient avoir une structure secondaire similaire. Par ailleurs, cette expérience est très délicate, elle demande un haut taux de conservation des éléments dans l'évolution des espèces pour réussir. Dans notre cas, tous les homologues de TLC1 ont réussi à compléter, à l'exception de *S. bayanus*. Pour ce dernier, l'incapacité à compléter est due à un faible taux de transcription de l'ARN homologue. En effet, un autre groupe a effectué la même expérience et a observé dans leur cas une complémentation (Chapell et Lundblad, 2004). La différence est que dans leur cas, au lieu d'utiliser un plasmide centromérique, ils ont plutôt opté pour un plasmide à haut nombre de copies, fournissant un plus grand nombre de copies de l'ARN homologue. Le problème se situe peut-être au niveau du promoteur de l'homologue *S. bayanus*. En effet, il est possible que les éléments de la levure *S. cerevisiae* ne soient pas en mesure de pouvoir s'associer à la région promotrice de l'ARN homologue, provoquant un faible taux de transcription. Dans le cas de *S. pastorianus*, il y a eu présence de complémentation (Tableau 3, Chapitre I). Par contre, lorsque le plasmide contenant l'ARN homologue est retiré par passage sur 5-FOA, une sénescence très rapide survient comparativement aux autres homologues. Cette perte de croissance instantanée suggère que l'ARN de l'espèce *S. paradoxus* est en mesure d'effectuer uniquement les fonctions de TLC1 à un niveau basal. On suppose que l'ARN homologues de *S. pastorianus* est en mesure de maintenir les télomères à une longueur qui se situe à la limite

minimale de ce que la cellule peut soutenir. En effet, les télomère de la souche complémentée par l'ARN homologue de *S. paradoxus* sont excessivement courts (Figure 11, Chapitre I).

Par ailleurs, il semble y avoir une corrélation entre la taille des télomères et distance évolutive des espèces par rapport à *S. cerevisiae*. En effet, plus les espèces sont éloignées dans l'évolution, plus la longueur des TRFs est courte à l'exception de *S. mikatae* (Figure 26). Il semblerait que plus la séquence primaire de l'ARN est divergente à celle de TLC1 (Voir article en annexe), plus cet ARN aurait de la difficulté à effectuer les fonctions, générant des télomères de taille légèrement inférieure.



Figure 28. Schéma récapitulatif de la taille des TRFs vs la distance évolutive. La taille des TRFs semble corrélée avec la distance dans l'évolution des différentes espèces dont l'ARN homologue de TLC1 a été utilisé pour effectuer les tests de complémentation. L'ARN homologue de *S. mikatae* génère toutefois des TRFs de longueur légèrement inférieure au contrôle positif (*S. cerevisiae*).

Lors de l'analyse phylogénétique il fallait procéder à un alignement des séquences, une étape très déterminante pour le résultat final. Afin d'obtenir un alignement adéquat des différentes séquences, nous avons déterminé l'extrémité 5' des ARNs des espèces. Les résultats nous ont démontré que l'ARN des espèces les moins distantes dans l'évolution avaient la même extrémité 5'. Par contre, dans le cas des espèces les plus éloignées, l'extrémité 5' divergeait. Le modèle pour la structure de TLC1 proposé est composé de 7 segments et d'une région plus ouverte constituant le corps central. Même si l'ARN de la télomérase de la levure est beaucoup plus long (1 300 nt) que chez les ciliés (150 nt) et les vertébrés (450 nt), plusieurs éléments semblent être conservés (Figure 27). En effet, pour ces espèces, la

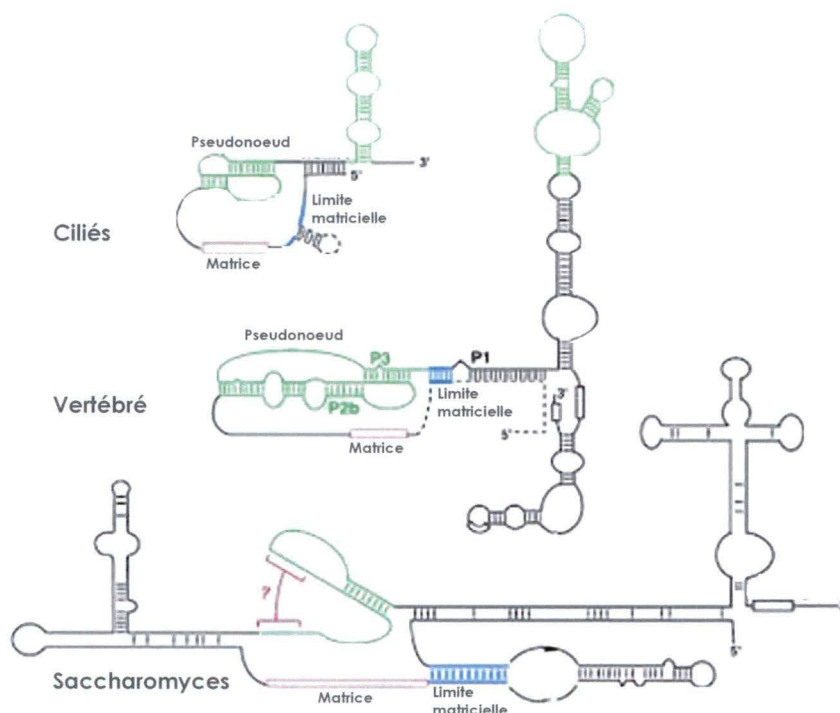


Figure 29. Modèle des structures secondaires des ARN de la télomérase des ciliés, vertébrés et Saccharomyces. Malgré leur différence de taille, les ARNs de la télomérase des différents organismes ont plusieurs éléments conservés. On observe entre autre la matrice (rouge), la limite matricielle (bleu) et le pseudonoeud. Adapté de (Theimer et Feigon, 2006).

matrice se retrouve au niveau de la région ouverte centrale. Cet élément est nécessairement conservé car la matrice se doit d'être accessible afin de lier son substrat : les télomères. Dans un deuxième temps, il est tout à fait logique que la matrice soit positionnée tout près du pseudonoeud qui est impliqué dans l'association avec la sous-unité catalytique Est2p (Chappell et Lundblad, 2004). Un troisième élément conservé est la limite matricielle (TBE : Template Boundary Element), évidemment située à proximité de la matrice. Chez les vertébrés cette région est appelée hélice P1, chez les ciliés elle est retrouvée entre l'hélice 1 et la matrice tandis que chez la levure, elle est localisée sur l'élément IIa (Figure 14, Chapitre I). Par ailleurs, il a été démontré chez les vertébrés et les ciliés que la sous-unité catalytique liait une structure appelée pseudonoeud (Leeper et Varani, 2005; Romero et Blackburn, 1991; ten Dam et al., 1991; Theimer et al., 2005). Par contre, chez la levure, la présence de cette structure n'a pas été encore prouvée. Cependant, la région liant la sous-unité catalytique de la levure *S. cerevisiae* a été remplacée par le pseudonoeud provenant de *Oxytricha nova* et de l'humain (Chappell et Lundblad, 2004). Cette expérience a démontré que les levures étaient quand même en mesure de maintenir la taille des télomères et de survivre. Il semble alors évident que la sous-unité reconnaît une structure particulière et non une séquence primaire spécifique. Dans notre étude, une structure a été proposée pour la région liant Est2p. Par contre, un autre groupe évoque la possibilité d'une structure différente, une structure davantage similaire à celle des vertébrés et des ciliés (Lin et al., 2004). Cependant, les

études de covariation ne permettent pas de discriminer aucune des deux structures (Révisé dans (Chen et Greider, 2004a)).

Le modèle de la structure de l'ARN de la télomérase a aussi été proposé par un autre groupe (Zappulla et Cech, 2004). La structure suggérée est très similaire à la notre (Commenté dans (Lustig, 2004)). Les éléments structuraux retrouvés sont majoritairement les mêmes que ceux proposés dans notre étude, même si moins d'espèces différentes ont été utilisées pour l'analyse phylogénétique. En effet, dans les deux cas, on identifie une région centrale ouverte composé de la matrice et du domaine de liaison à Est2p duquel émerge plusieurs segments reliés et un très long bras auquel sont réunis plusieurs éléments. Le seul élément nouveau apporté, est qu'ils proposent une flexibilité exceptionnelle de TLC1 en déplaçant le site de liaison à Est1p à différents endroits sur l'ARN. Cette flexibilité a été confirmé lors d'expérience de minimisation de l'ARN de la télomérase de *S. cerevisiae* (Zappulla et al., 2005). En effet, il a été démontré qu'une grande partie de l'ARN de *TLC1* pouvait être réséquée. En effet, avec seulement 384 nt (au lieu de 1 200 nt) la télomérase pouvait être encore fonctionnelle, mais avec une efficacité minimale.

Aussi, des expériences de cartographie au DMS (DMS : diméthylsulfoxyde) effectué par un autre groupe sur une portion de l'ARN, sont venus confirmer en partie la structure que nous avons proposée (Forstemann

et Lingner, 2005). Par contre, les expériences de cartographie ne permettent pas, encore une fois, de favoriser une structure du pseudonoeud par rapport à l'autre.

En sommes, les différents modèles de structure de l'ARN de la télomérase de *S. cerevisiae* (Chappell et Lundblad, 2004; Dandjinou et al., 2004; Lin et al., 2004; Zappulla et Cech, 2004) vont permettre des avancées dans la compréhension de l'assemblage et les fonctions de la télomérase. En effet, nous sommes maintenant en mesure de cibler les régions impliquées dans l'activité catalytique de l'enzyme mais aussi de plusieurs grandes régions avec aucune protéine liée et encore aucune fonctions attribuées qui pourraient aussi faire l'objet d'études intéressantes.

Recherche de mutants sensibles au froid dans le but d'étudier la structure tridimensionnelle de l'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae*.

Après avoir déterminé un modèle pour la structure secondaire de l'ARN de la télomérase de la levure *S. cerevisiae*, nous nous sommes intéressés aux interactions intramoléculaires déterminantes pour les fonctions de TLC1. Un criblage de mutants sensible au froid a donc été mis au point avec une librairie de mutants de *TLC1*. L'expérience est basée sur le principe que les interactions à 18°C sont beaucoup plus stables qu'à 30°C. Donc, une mutation qui stabilise davantage l'interaction à 18°C devrait provoquer la

sénescence des cellules, tandis qu'à 30°C, les cellules ne devraient avoir aucun problème de croissance car les molécules, dans ce cas-ci, peuvent toujours être dynamiques.

Par ailleurs, l'obtention de mutants sensible au froid pour cet ARN est beaucoup plus difficile du fait que l'ARN est remarquablement long (1 300 nt). En effet, des études antérieures sur des mutants sensibles au froid ont été effectuées sur des ARNs très courts, comme l'ARN U2 (Zavanelli et al., 1994). Comme mentionné précédemment, TLC1 est très long et de ce fait il est excessivement flexible. Donc, une mutation dans TLC1 a beaucoup plus de chance de passer inaperçue que dans U2, qui est très petit (120 nt) et, de ce fait, très peu souple. Par ailleurs, des études ont démontrées que plus de la moitié de l'ARN de TLC1 peut être enlevé sans que la cellule ne meure (Zappulla et al., 2005). Les mutants retrouvés dans cette étude devraient alors occuper des mutations qui interrompent des interactions cruciales au bon fonctionnement de l'enzyme. Les sites de mutations potentiels devraient se situer dans les régions impliquées dans la catalyse de l'enzyme, c'est-à-dire au niveau du domaine liant Est2p et Est1p, de la matrice, etc.

Des 20 000 clones criblés, 10 se sont avérés à présenter un réel phénotype de thermosensibilité à 18°C. En effet, les cellules thermosensibles avaient soit de la difficulté à pousser, soit elles formaient de très petites colonies. La taille des télomères des souches comprenant les clones

thermosensibles a été observée. Les clones 4, 5, 6 et 8 ont semblés démontrer des TRFs faiblement plus long à 18°C qu'à 30°C, autant à 20G que 100G. Par ailleurs, ces mutants ont des mutations localisées à un endroit très précis sur la tige-boucle IId. Cette région est peut-être critique pour le bon fonctionnement de la télomérase. Nous nous serions d'abord attendu à ce que les TRFs des clones thermosensibles soient plus courts à 18°C qu'à 30°C étant donné qu'ils avaient de la difficulté à pousser à 18°C. Par contre, il a déjà été observé dans le passé que les mutants de certaines protéines associées aux télomères provoquaient une élongation de la taille des télomères mais aussi une difficulté de croissance (Grandin et al., 2001b). Un phénomène similaire pourrait se produire chez les mutants de TLC1 thermosensibles. Par ailleurs, les différentes mutations pourraient aussi induire un renforcement des liaisons avec les composantes de la télomérase. Cette liaison accrue pourrait faire en sorte que les télomères pourraient allongés plus longuement. De ce fait, un arrêt du cycle cellulaire pourrait être provoqué, afin d'attendre la fin de l'élongation de la télomérase et ainsi on assisterait à une croissance beaucoup plus lente des cellules.

Bref, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les résultats observés. Une analyse plus approfondie des différents clones thermosensibles qui démontrent un phénotype télomériques devra être faite afin d'établir réellement les mécanismes cellulaires qui entraînent les phénotypes visualisés. Par contre, ces données tout a fait nouvelles, nous

procurent une nouvelle avenue d'investigation au niveau de la structure/fonction de l'ARN de la télomérase.

Développement d'une méthode de purification de la télomérase chez *S. cerevisiae* afin de découvrir de nouvelles composantes du complexe.

Après avoir déterminé un modèle de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase, nous avons remarqué qu'il y avait plusieurs grandes régions sans aucune protéine connue qui pourrait s'y lier. Déjà quelques protéines sont répertoriées pour se lier à certaines régions de TLC1, mais nous supposons qu'il y en a beaucoup plus. Dans le but de découvrir d'autres composantes du complexe, nous avons mis au point une méthode de purification de la télomérase. Afin de garder les protéines à purifier sous forme native, nous avons délaissé l'ajout d'étiquette aux protéines pour l'introduction d'une étiquette ARN à la composante TLC1.

L'étiquette choisie est très petite (60 nt) (Figure 22, Chapitre III), ce qui diminue les risques que l'ARN soit encombré par l'étiquette ainsi que les risques de mauvais appariements une fois intégré dans la molécule. L'étiquette S1 a été introduite à l'extrémité de tige-boucles dont encore aucune protéine connue n'y est associée, diminuant ainsi les risques d'obstruction. Le choix de positionner l'étiquette ARN au bout des tige-boucles, a aussi été considéré dans le but d'exposer davantage l'étiquette

hors du complexe afin qu'il soit le plus possible accessible pour les billes. L'étiquette S1 a été développée par SELEX pour avoir une affinité très grande pour la streptavidine (K_d 70 nM) mais inférieure à celle de la biotine (K_d 0,1 μ M) (Srisawat et Engelke, 2002). La molécule de biotine peut alors être utilisée pour décrocher les complexes des billes tout en évitant de les dénaturer. Par ailleurs, des expériences que nous avons effectuées, prouvent hors de tout doute que l'étiquette seule est en mesure de lier de façon efficace les billes de streptavidine (Tableau 6, Chapitre III).

Aussi, la purification de l'ARN RPR1 avec l'étiquette avec ce même aptamère déjà publié (Srisawat et Engelke, 2002) et que nous avons reproduit, fonctionne à un niveau respectable (23%). Par contre, la purification de l'ARN de TLC1 avec l'étiquette S1, engendre un taux d'enrichissement de l'ARN considérablement inférieur (1,5% à 5,5%). Ce rendement est, sans contredit, insuffisant pour se lancer dans la recherche d'autres composantes associées à la télomérase. En effet, dans une cellule haploïde, on retrouve environ 30 copies de TLC1 (Mozdy et Cech, 2006). Avec un taux de récupération maximal se limitant à 5%, le nombre de copies de TLC1 se limite à 1,5 par cellule. Donc, si on considère qu'une sous-unité catalytique lie une copie de TLC1, dans 1L on devrait retrouver au maximum 25 ng de Est2p! Il nous faudrait alors faire au minimum 20L de culture juste pour faire un gel de protéine coloré au bleu Coomassie afin de visualiser la protéine. Donc, les

chances de réussir à purifier suffisamment de protéines pour nous permettre de les identifier sont plutôt faibles.

Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi l'ARN de *TLC1* est difficile à purifier. Il est possible que l'étiquette, une fois introduit dans l'ARN de la télomérase, se replie inadéquatement. Cette hypothèse avait été mise de côté au départ car le repliement avait été vérifié à l'aide d'outils bioinformatiques. Cependant, il est difficile de garantir comment les molécules vont se comporter *in vivo*. Aussi, nous n'excluons pas le fait que peut-être une protéine est en mesure de venir se lier très près de la région où se retrouve l'étiquette dans l'ARN et venir provoquer de l'encombrement stérique empêchant celui-ci d'interagir avec les billes. Finalement, il a des chances que les tige-boucles choisies pour introduire l'aptamère S1 se replient vers l'intérieur du complexe rendant l'étiquette complètement inaccessible pour les billes de streptavidine.

Bref, cette méthode ne semble pas adéquate pour procéder à la purification du complexe de la télomérase. Même avec la mise au point des conditions, le plus haut rendement obtenu est minime. Il est à craindre que même avec le repositionnement de l'étiquette ailleurs sur la molécule, les mêmes problèmes surviendront.

En sommes, ce manuscrit élabore, dans un premier temps, sur des expériences qui ont aidées à établir un modèle de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*. Dans un deuxième temps, un criblage de mutants sensibles au froid de l'ARN de la télomérase a permis d'isoler quelques clones qui pourraient nous aider à caractériser d'avantage la structure/fonction de cet ARN. Finalement, une méthode de purification du complexe de la télomérase chez la levure a été proposée. Cependant, cette méthode, utilisant l'ARN du complexe pour isoler les diverses composantes associées, s'est avérée inefficace.

VII. Remerciements

Je voudrais accorder mes remerciements à Raymund Wellinger pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que de m'avoir donné une grande latitude dans mes projets. Je veux remercier par la même occasion tous les membres du laboratoire et plus particulièrement Alain T. Dandjinou qui a contribué à la plupart de mes projets. Finalement, je voudrais exprimer ma gratitude à mes proches qui m'ont appuyé tout au long de mes études.

VIII. Références

Ancelin, K., Brun, C., et Gilson, E. (1998). Role of the telomeric DNA-binding protein TRF2 in the stability of human chromosome ends. *Bioessays* 20, 879-883.

Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C.E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J.P., Sabatier, L., et Gilson, E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Molecular and cellular biology* 22, 3474-3487.

Auffinger, P., et Westhof, E. (2000). RNA solvation: a molecular dynamics simulation perspective. *Biopolymers* 56, 266-274.

Autexier, C., et Greider, C.W. (1998). Mutational analysis of the *Tetrahymena* telomerase RNA: identification of residues affecting telomerase activity in vitro. *Nucleic acids research* 26, 787-795.

Autexier, C., et Triki, I. (1999). *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein RNA-protein interactions. *Nucleic acids research* 27, 2227-2234.

Baumann, P. (2006). Are mouse telomeres going to pot? *Cell* 126, 33-36.

Baumann, P., et Cech, T.R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.

- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., et de Lange, T. (1997).** TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *The EMBO journal* 16, 1785-1794.
- Biessmann, H., et Mason, J.M. (1992).** Genetics and molecular biology of telomeres. *Advances in genetics* 30, 185-249.
- Biessmann, H., Walter, M.F., et Mason, J.M. (1997).** Drosophila telomere elongation. *Ciba Foundation symposium* 211, 53-67; discussion 67-70.
- Blackburn, E.H., et Gall, J.G. (1978).** A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *Journal of molecular biology* 120, 33-53.
- Blasco, M.A., Funk, W., Villeponteau, B., et Greider, C.W. (1995).** Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., et Greider, C.W. (1997).** Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., et Fink, G.R. (1987).** 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology* 154, 164-175.
- Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., et Lue, N.F. (2003).** Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278, 3882-3890.

- Brand, A.H., Micklem, G., et Nasmyth, K.** (1987). A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell* 51, 709-719.
- Broccoli, D., Young, J.W., et de Lange, T.** (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9082-9086.
- Chan, C.S., et Tye, B.K.** (1983). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* 33, 563-573.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I., et Lundblad, V.** (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & development* 15, 404-414.
- Chapon, C., Cech, T.R., et Zaug, A.J.** (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* 3, 1337-1351.
- Chappell, A.S., et Lundblad, V.** (2004). Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase. *Molecular and cellular biology* 24, 7720-7736.
- Chen, J.L., Blasco, M.A., et Greider, C.W.** (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-514.
- Chen, J.L., et Greider, C.W.** (2004a). An emerging consensus for telomerase RNA structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14683-14684.

- Chen, J.L., et Greider, C.W.** (2004b). Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends in biochemical sciences* 29, 183-192.
- Chen, J.L., et Greider, C.W.** (2005). Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8080-8085; discussion 8077-8089.
- Chikashige, Y., Ding, D.Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M., et Hiraoka, Y.** (1994). Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* 264, 270-273.
- Cliften, P.F., Hillier, L.W., Fulton, L., Graves, T., Miner, T., Gish, W.R., Waterston, R.H., et Johnston, M.** (2001). Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome research* 11, 1175-1186.
- Cohn, M., et Blackburn, E.H.** (1995). Telomerase in yeast. *Science* 269, 396-400.
- Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R., et Reddel, R.R.** (2003). Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* 13, 942-946.
- Cong, Y.S., et Bacchetti, S.** (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 35665-35668.

- Cong, Y.S., Wen, J., et Bacchetti, S.** (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human molecular genetics* 8, 137-142.
- Conrad, M.N., Wright, J.H., Wolf, A.J., et Zakian, V.A.** (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 63, 739-750.
- Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C., et Cech, T.R.** (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385, 744-747.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., et Bacchetti, S.** (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal* 11, 1921-1929.
- Counter, C.M., Gupta, J., Harley, C.B., Leber, B., et Bacchetti, S.** (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85, 2315-2320.
- Counter, C.M., Hirte, H.W., Bacchetti, S., et Harley, C.B.** (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2900-2904.
- Counter, C.M., Meyerson, M., Eaton, E.N., et Weinberg, R.A.** (1997). The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9202-9207.

- Dandjinou, A.T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Abou Elela, S., et Wellinger, R.J.** (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* 14, 1148-1158.
- de Bruin, D., Kantrow, S.M., Liberatore, R.A., et Zakian, V.A.** (2000). Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Molecular and cellular biology* 20, 7991-8000.
- Dionne, I., et Wellinger, R.J.** (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13902-13907.
- Dragon, F., Pogacic, V., et Filipowicz, W.** (2000). In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Molecular and cellular biology* 20, 3037-3048.
- Dunn, B., Szauter, P., Pardue, M.L., et Szostak, J.W.** (1984). Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* 39, 191-201.
- Evans, S.K., et Lundblad, V.** (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.
- Evans, S.K., et Lundblad, V.** (2002). The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* 162, 1101-1115.
- Feinberg, A.P., et Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical biochemistry* 132, 6-13.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.

Forstemann, K., et Lingner, J. (2005). Telomerase limits the extent of base pairing between template RNA and telomeric DNA. *EMBO reports* 6, 361-366.

Friedman, K.L., et Cech, T.R. (1999). Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes & development* 13, 2863-2874.

Friedman, K.L., Heit, J.J., Long, D.M., et Cech, T.R. (2003). N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Molecular biology of the cell* 14, 1-13.

Garvik, B., Carson, M., et Hartwell, L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular and cellular biology* 15, 6128-6138.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., et Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.

Gilley, D., et Blackburn, E.H. (1999). The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6621-6625.

- Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D., et Gasser, S.M.** (1993). Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *Journal of molecular biology* 231, 293-310.
- Grandin, N., Damon, C., et Charbonneau, M.** (2001a). Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *The EMBO journal* 20, 6127-6139.
- Grandin, N., Damon, C., et Charbonneau, M.** (2001b). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *The EMBO journal* 20, 1173-1183.
- Grandin, N., Reed, S.I., et Charbonneau, M.** (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes & development* 11, 512-527.
- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., et Wellinger, R.J.** (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-744.
- Greener, A., et Callahan, M.** (1994). XL1-Red: a highly efficient random mutagenesis strain. *Strategies*. 7:32-34.
- Greider, C.W., et Blackburn, E.H.** (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Greider, C.W., et Blackburn, E.H.** (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.

- Greider, C.W., et Blackburn, E.H.** (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., et de Lange, T.** (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Hardy, C.F., Sussel, L., et Shore, D.** (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes & development* 6, 801-814.
- Hargrove, B.W., Bhattacharyya, A., Domitrovich, A.M., Kapler, G.M., Kirk, K., Shippen, D.E., et Kunkel, G.R.** (1999). Identification of an essential proximal sequence element in the promoter of the telomerase RNA gene of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic acids research* 27, 4269-4275.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., et Greider, C.W.** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Hartwell, L.H.** (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological reviews* 38, 164-198.
- Henras, A., Dez, C., Noaillac-Depeyre, J., Henry, Y., et Caizergues-Ferrer, M.** (2001). Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p. *Nucleic acids research* 29, 2733-2746.
- Hinkley, C.S., Blasco, M.A., Funk, W.D., Feng, J., Villeponteau, B., Greider, C.W., et Herr, W.** (1998). The mouse telomerase RNA 5'-end

lies just upstream of the telomerase template sequence. *Nucleic acids research* 26, 532-536.

Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., et de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63-77.

Hoffman, C.S., et Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

Horowitz, H., et Haber, J.E. (1985). Identification of autonomously replicating circular subtelomeric Y' elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 5, 2369-2380.

Horvath, M.P., Schweiker, V.L., Bevilacqua, J.M., Ruggles, J.A., et Schultz, S.C. (1998). Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* 95, 963-974.

Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., et Chen, D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & development* 14, 2807-2812.

Hughes, T.R., Evans, S.K., Weilbaecher, R.G., et Lundblad, V. (2000). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* 10, 809-812.

Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., et Jefferson, R.A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals

complex splicing patterns in different cell types. *Human molecular genetics* 6, 2011-2019.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., et Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kipling, D. et Cooke, H. J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 247, 400-402.

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P., et Prescott, D. M.(1981). All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3015-3019.

Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L., et Rhodes, D. (1996). The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* 85, 125-136.

Kyrion, G., Boakye, K.A., et Lustig, A.J. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 12, 5159-5173.

Lai, C.K., Miller, M.C., et Collins, K. (2003). Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Molecular cell* 11, 1673-1683.

Laroche, T., Martin, S.G., Gotta, M., Gorham, H.C., Pryde, F.E., Louis, E.J., et Gasser, S.M. (1998). Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* 8, 653-656.

- Larrivee, M., LeBel, C., et Wellinger, R.J.** (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes & development* *18*, 1391-1396.
- Larson, D.D., Spangler, E.A., et Blackburn, E.H.** (1987). Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell* *50*, 477-483.
- Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., et Greider, C.W.** (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* *152*, 143-152.
- Lee, J.Y., Rohlman, C.E., Molony, L.A., et Engelke, D.R.** (1991). Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Molecular and cellular biology* *11*, 721-730.
- Leeper, T.C., et Varani, G.** (2005). The structure of an enzyme-activating fragment of human telomerase RNA. *RNA* *11*, 394-403.
- Lendvay, T.S., Morris, D.K., Sah, J., Balasubramanian, B., et Lundblad, V.** (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* *144*, 1399-1412.
- Levis, R.W., Ganesan, R., Houtchens, K., Tolar, L.A., et Sheen, F.M.** (1993). Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell* *75*, 1083-1093.
- Licht, J.D., et Collins, K.** (1999). Telomerase RNA function in recombinant *Tetrahymena* telomerase. *Genes & development* *13*, 1116-1125.

- Lin, J., Ly, H., Hussain, A., Abraham, M., Pearl, S., Tzfati, Y., Parslow, T.G., et Blackburn, E.H.** (2004). A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14713-14718.
- Lin, J.J., et Zakian, V.A.** (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13760-13765.
- Lingner, J., et Cech, T.R.** (1996). Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10712-10717.
- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R., et Lundblad, V.** (1997). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11190-11195.
- Livengood, A.J., Zaug, A.J., et Cech, T.R.** (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Molecular and cellular biology* 22, 2366-2374.
- Loayza, D., et De Lange, T.** (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.

- Louis, E.J., et Haber, J.E.** (1990). The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* 124, 533-545.
- Lundblad, V., et Blackburn, E.H.** (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.
- Lundblad, V., et Szostak, J.W.** (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.
- Lustig, A.J.** (2004). Telomerase RNA: a flexible RNA scaffold for telomerase biosynthesis. *Curr Biol* 14, R565-567.
- Ly, H., Schertzer, M., Jastaniah, W., Davis, J., Yong, S.L., Ouyang, Q., Blackburn, E.H., Parslow, T.G., et Lansdorp, P.M.** (2005). Identification and functional characterization of 2 variant alleles of the telomerase RNA template gene (TERC) in a patient with dyskeratosis congenita. *Blood* 106, 1246-1252.
- Marcand, S., Gilson, E., et Shore, D.** (1997). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986-990.
- Marrone, A., Walne, A., et Dokal, I.** (2005). Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation. *Current opinion in genetics & development* 15, 249-257.
- Mason, D.X., Goneska, E., et Greider, C.W.** (2003). Stem-loop IV of tetrahymena telomerase RNA stimulates processivity in trans. *Molecular and cellular biology* 23, 5606-5613.

- Mattaj, I.W.** (1986). Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* 46, 905-911.
- McClintock, B.** (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 25, 405-416.
- McCormick-Graham, M., et Romero, D.P.** (1995). Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic acids research* 23, 1091-1097.
- McEarchern, M. J. et Hicks, J. B.**(1993). Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 13, 551-560.
- McEarchern, M. J. et Blackburn, E. H.**(1994). A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3453-3457.
- McElligott, R., et Wellinger, R.J.** (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *The EMBO journal* 16, 3705-3714.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., et al.** (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Mishra, K., et Shore, D.** (1999). Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr Biol* 9, 1123-1126.

- Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y.S., Wen, J., Hirte, H.W., Piaggio, G., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Bacchetti, S., et al.** (2000). Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Molecular and cellular biology* 20, 3764-3771.
- Mitchell, J.R., Cheng, J., et Collins, K.** (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Molecular and cellular biology* 19, 567-576.
- Mitton-Fry, R.M., Anderson, E.M., Hughes, T.R., Lundblad, V., et Wuttke, D.S.** (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* 296, 145-147.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., et Wu, J. R.** (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6622-6.
- Mozdy, A.D., et Cech, T.R.** (2006). Low abundance of telomerase in yeast: implications for telomerase haploinsufficiency. *RNA* (New York, NY 12, 1721-1737.
- Muller, H. J.** (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting Net*, 8, 182-195, 198.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., et Cech, T.R.** (1997). Telomerase

catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.

Nielsen, L., et Edstrom, J.E. (1993). Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular and cellular biology* 13, 1583-1589.

Niida, H., Matsumoto, T., Satoh, H., Shiwa, M., Tokutake, Y., Furuichi, Y., et Shinkai, Y. (1998). Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nature genetics* 19, 203-206.

Nugent, C.I., Bosco, G., Ross, L.O., Evans, S.K., Salinger, A.P., Moore, J.K., Haber, J.E., et Lundblad, V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* 8, 657-660.

Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F., et Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249-252.

O'Reilly, M., Teichmann, S.A., et Rhodes, D. (1999). Telomerases. *Current opinion in structural biology* 9, 56-65.

Osterhage, J.L., Talley, J.M., et Friedman, K.L. (2006). Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature structural & molecular biology* 13, 720-728.

Pardo, B., et Marcand, S. (2005). Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *The EMBO journal* 24, 3117-3127.

- Pardue, M.L., Danilevskaya, O.N., Lowenhaupt, K., Slot, F., et Traverse, K.L.** (1996). *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *Trends Genet* 12, 48-52.
- Peng, Y., Mian, I.S., et Lue, N.F.** (2001). Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Molecular cell* 7, 1201-1211.
- Pennock, E., Buckley, K., et Lundblad, V.** (2001). Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104, 387-396.
- Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., et Gottschling, D.E.** (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nature genetics* 27, 64-67.
- Plessel, G., Fischer, U., et Luhrmann, R.** (1994). m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Molecular and cellular biology* 14, 4160-4172.
- Pogacic, V., Dragon, F., et Filipowicz, W.** (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Molecular and cellular biology* 20, 9028-9040.
- Polotnianka, R.M., Li, J., et Lustig, A.J.** (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* 8, 831-834.

- Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B., et Petes, T.D.** (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 24, 582-585.
- Prathapam, R., Witkin, K.L., O'Connor, C.M., et Collins, K.** (2005). A telomerase holoenzyme protein enhances telomerase RNA assembly with telomerase reverse transcriptase. *Nature structural & molecular biology* 12, 252-257.
- Qi, H., et Zakian, V.A.** (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes & development* 14, 1777-1788.
- Ray, A., et Runge, K.W.** (1998). The C terminus of the major yeast telomere binding protein Rap1p enhances telomere formation. *Molecular and cellular biology* 18, 1284-1295.
- Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P., et Lingner, J.** (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* 13, 568-574.
- Reynolds, A.E., McCarroll, R.M., Newlon, C.S., et Fangman, W.L.** (1989). Time of replication of ARS elements along yeast chromosome III. *Molecular and cellular biology* 9, 4488-4494.
- Richards, E. J. et Ausubel, F. M.** (1988). Isolation of a higher eukariotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53, 127-136.

- Romero, D.P., et Blackburn, E.H.** (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343-353.
- Rose, A.B., et Broach, J.R.** (1990). Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors. *Methods in enzymology* 185, 234-279.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2^e éd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E., et Geli, V.** (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature genetics* 36, 46-54.
- Seto, A.G., Livengood, A.J., Tzfati, Y., Blackburn, E.H., et Cech, T.R.** (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes & development* 16, 2800-2812.
- Seto, A.G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaug, A.J., Blackburn, E.H., et Cech, T.R.** (2003). A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *RNA* 9, 1323-1332.
- Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., et Cech, T.R.** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.
- Shampay, J., Szostak, J. W., Blackburn, E. H.** (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154-157.

- Shay, J.W., et Bacchetti, S.** (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
- Sikorski, R.S., et Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Singer, M.S., et Gottschling, D.E.** (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
- Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A., et de Lange, T.** (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G., et de Lange, T.** (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular and cellular biology* 20, 1659-1668.
- Snow, B.E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R.M., Robinson, M.O., et Harrington, L.** (2003). Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* 13, 698-704.
- Spee, J.H., de Vos, W.M., et Kuipers, O.P.** (1993). Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic acids research* 21, 777-778.
- Sperger, J.M., et Cech, T.R.** (2001). A stem-loop of *Tetrahymena* telomerase RNA distant from the template potentiates RNA folding and telomerase activity. *Biochemistry* 40, 7005-7016.

- Srisawat, C., et Engelke, D.R.** (2001). Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA* (New York, NY 7, 632-641.
- Srisawat, C., et Engelke, D.R.** (2002). RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. *Methods* (San Diego, Calif 26, 156-161.
- Suka, N., Luo, K., et Grunstein, M.** (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nature genetics* 32, 378-383.
- Sussel, L., et Shore, D.** (1991). Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7749-7753.
- Taggart, A.K., Teng, S.C., et Zakian, V.A.** (2002). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* 297, 1023-1026.
- ten Dam, E., van Belkum, A., et Pleij, K.** (1991). A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic acids research* 19, 6951.
- Theimer, C.A., Blois, C.A., et Feigon, J.** (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Molecular cell* 17, 671-682.

- Theimer, C.A., et Feigon, J.** (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Current opinion in structural biology* 16, 307-318.
- Tzfati, Y., Fulton, T.B., Roy, J., et Blackburn, E.H.** (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* 288, 863-867.
- Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., et Blackburn, E.H.** (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes & development* 17, 1779-1788.
- Van Steensel, B. A., Smorgorzewska, et T. de Lange** (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vega, L.R., Mateyak, M.K., et Zakian, V.A.** (2003). Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nature reviews* 4, 948-959.
- Vulliamy, T., Marrone, A., Szydlo, R., Walne, A., Mason, P.J., et Dokal, I.** (2004). Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nature genetics* 36, 447-449.
- Vulliamy, T.J., Marrone, A., Knight, S.W., Walne, A., Mason, P.J., et Dokal, I.** (2006). Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. *Blood* 107, 2680-2685.
- Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D., et Hannon, G.J.** (1998). Myc activates telomerase. *Genes & development* 12, 1769-1774.

- Wellinger, R.J., Wolf, A.J., et Zakian, V.A. (1993).** Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.
- Wellinger, R.J., et Zakian, V.A. (1989).** Lack of positional requirements for autonomously replicating sequence elements on artificial yeast chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 973-977.
- Witkin, K.L., et Collins, K. (2004).** Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes & development* 18, 1107-1118.
- Wong, J.M., Kusdra, L., et Collins, K. (2002).** Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature cell biology* 4, 731-736.
- Wotton, D., et Shore, D. (1997).** A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 11, 748-760.
- Wright, J.H., Gottschling, D.E., et Zakian, V.A. (1992).** Saccharomyces telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes & development* 6, 197-210.
- Wright, J.H., et Zakian, V.A. (1995).** Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 23, 1454-1460.

- Wright, W.E., et Shay, J.W.** (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental gerontology* 27, 383-389.
- Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., et Shay, J.W.** (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & development* 11, 2801-2809.
- Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M., et al.** (2006). Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126, 49-62.
- Yasumoto, S., Kunitura, C., Kikuchi, K., Tahara, H., Ohji, H., Yamamoto, H., Ide, T., et Utao, T.** (1996). Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13, 433-439.
- Ye, J.Z., et de Lange, T.** (2004). TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nature genetics* 36, 618-623.
- Yeh, L.C., et Lee, J.C.** (1992). Structure analysis of the 5' external transcribed spacer of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology* 228, 827-839.
- Zakian, V.A., et Blanton, H.M.** (1988). Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 8, 2257-2260.

- Zappulla, D.C., et Cech, T.R.** (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 10024-10029.
- Zappulla, D.C., Goodrich, K., et Cech, T.R.** (2005). A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nature structural & molecular biology* *12*, 1072-1077.
- Zaug, A.J., Linger, J., et Cech, T.R.** (1996). Method for determining RNA 3' ends and application to human telomerase RNA. *Nucleic acids research* *24*, 532-533.
- Zavanelli, M.I., Britton, J.S., Igel, A.H., et Ares, M., Jr.** (1994). Mutations in an essential U2 small nuclear RNA structure cause cold-sensitive U2 small nuclear ribonucleoprotein function by favoring competing alternative U2 RNA structures. *Molecular and cellular biology* *14*, 1689-1697.
- Zhou, J., Hidaka, K., et Futcher, B.** (2000). The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Molecular and cellular biology* *20*, 1947-1955.
- Zhou, X.Z., et Lu, K.P.** (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* *107*, 347-359.

IX. Annexes

Autorisation des co-auteurs.....	125
Manuscrit édité.....	126

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussigné(e)s, soussigné(e)s, co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constitutive du mémoire ☒ de la thèse ☐

de l'étudiant(e) (nom) : Nancy Lévesque

Inscrit(e) au programme de Microbiologie

de la Faculté de Médecine

de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature Alain T. Dandjinou

Date : 18 sept 2006

Nom Alain T. Dandjinou

Coordonnées Cornell University; Department of Microbiology
1300 York Avenue #B305 New York NY10021, USA

Signature Stéphanie Lacroix

Date : 9 novembre 2006

Nom Stéphanie Lacroix

Coordonnées Université de Sherbrooke, Département microbiologie
3601 12^e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec

Signature JF Lucien

Date : 9 novembre 2006

Nom JEAN-FRANÇOIS LUCIEN

Coordonnées Université de Sherbrooke, Département microbiologie
3601 12^e Av Nord, Sherbrooke, Québec

Signature _____

Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : A phylogenetical
based secondary structure for the yeast telomerase RNA

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☒ de la thèse ☐

de l'étudiant(e) (nom) : Nancy Lévesque

inscrit(e) au programme de Microbiologie

de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature [Signature] Date : 8.3.2007

Nom Wellinger Raymond

Coordonnées Fac. Médecine, Microbiologie
3001 12^e Ave Nord
Sherbrooke, QC J1H 5N4

Signature [Signature] Date : 8/3/2007

Nom SARIF ABOUELELA

Coordonnées 3001 12^e Ave Nord
Sherbrooke, QC J1H 5N4

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

Title:

A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA.

Alain T. Dandjinou, Nancy Lévesque, Stéphanie Larose, Jean-François Lucier, Sherif Abou Elela and Raymund J. Wellinger*

Groupe ARN/RNA Group,
Department of Microbiology and Infectious Diseases
Faculty of Medicine
Université de Sherbrooke

3001 12th Ave N.
Sherbrooke, QC
J1H 5N4
Canada

*Corresponding author
Tel.: 819 564 5214
Fax.: 819 564 5392
Email: Raymund.Wellinger@Usherbrooke.ca

Running Head: Yeast telomerase RNA structure

SUMMARY

Background: Telomerase is a ribonucleoprotein complex whose RNA moiety dictates the addition of specific simple sequences onto chromosomes ends.

While relevant for certain human genetic diseases, the contribution of the essential telomerase RNA to RNP assembly still remains unclear.

Phylogenetic analyses of vertebrate and ciliate telomerase RNAs revealed conserved elements that potentially organize protein subunits for RNP function. In contrast, the yeast telomerase RNA could not be fitted to any known structural model and the limited number of known sequences from *Saccharomyces* species did not permit the prediction of a yeast specific conserved structure.

Results: We cloned and analyzed the complete telomerase RNA loci (*TLC1*) from all known *Saccharomyces* species belonging to the “sensu stricto” group. Complementation analyses in *S. cerevisiae* and end-mappings of mature RNAs ensured the relevance of the cloned sequences. Using phylogenetic comparative analysis coupled with in vitro enzymatic probing, we derived a secondary structure prediction of the *Saccharomyces cerevisiae* *TLC1* RNA. This conserved secondary structure prediction includes a central domain that is likely to orchestrate DNA synthesis and at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. The structure also reveals a potential tertiary interaction between two loops in the central core.

Conclusion: The predicted secondary structure of the TLC1 RNA of *S. cerevisiae* reveals a distinct folding pattern featuring well separated but conserved functional elements. The predicted structure now allows for a detailed and rationally designed study to the structure-function relationships within the telomerase RNP-complex in a genetically tractable system.

INTRODUCTION

Telomeres, the terminal portion of the linear eukaryotic chromosomes, are composed of specialized nucleoprotein complexes that ensure protection of chromosomal DNA [1, 2]. Telomeric DNA comprises specific short direct repeats and their maintenance is assured by a specialized ribonucleoparticle (RNP) called telomerase. Minimally, telomerase contains the catalytic protein component TERT (TElomerase Reverse Transcriptase; Est2p in yeast [3, 4]) and an associated RNA moiety (TER: TElomerase RNA; TLC1 in yeast, [5, 6]). The addition of telomere-specific repeated sequences is templated by a small segment residing on this essential RNA moiety [5, 7]. In addition to this templating function, the TERT/telomerase RNA complex provides constitutive or transient binding sites for a variety of other proteins, some of which are essential for in vivo activity [4, 8, 9]. For humans, telomerase activation is closely associated with cellular immortalization and ultimately cancer development, but the clinical importance of telomerase extends beyond this role in cancer since several genetic diseases such as dyskeratosis congenita

and aplastic anaemia have been associated with mutations in the RNA subunit of telomerase [6]. Therefore, the RNA component of telomerase may have additional and so far unknown roles in cellular metabolism which may be associated with RNP biogenesis.

In *Saccharomyces cerevisiae*, the telomerase RNA (TLC1) is about 1,200 bases long, transcribed by RNA polymerase II and matured through acquisition of a 5'-trimethylguanosine cap and in association with Sm-proteins [5, 10, 11]. Previous work based on mutagenesis, deletions and sequence comparisons between distant yeasts established a few functional elements of this RNA: an essential central portion that is associated with TERT/Est2p [12], a conserved bulged stem that is important for Est1p association [13], and a conserved short stem which serves as template boundary element [14], and a stem loop element that binds the Yku-complex [15, 16]. However, the global structure of the TLC1 RNA remained unknown, which hampers the understanding of the mechanism of the telomerase RNP biogenesis and function. Phylogenetic analysis of primary sequences is amongst the most powerful tools to arrive at a working model for the secondary structure of RNAs [17-19]. This approach has been successfully used to establish secondary structures of the ciliate and vertebrate telomerase RNAs [20-23]. However, for *Saccharomyces* species, the limited availability of sequences derived from evolutionary closely related species as well as the large size of the TLC1 RNA were major obstacles for a similar approach.

Here we report the cloning, sequencing and functional analysis of the *TLC1* genes of all *Saccharomyces* species being part of the closely related “sensu stricto” group [24, 25]. Individual pairwise comparisons of the individual sequences to the *Saccharomyces cerevisiae* S288C RNA revealed homologies that range between 98% and 59%, which allowed reliable sequence alignment and covariation analyses of base-pairs in predicted stems. Selected regions in the predicted structure were subsequently confirmed by biochemical mapping. The proposed secondary structure is consistent with the previously established sub-elements and reveals a central domain that is likely to associate with TERT/Est2p to orchestrate DNA synthesis, as well as at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. Finally, a comparison of the proposed structure for the yeast RNA with those of the vertebrate and ciliate RNAs suggests that the central core element may have a conserved structural organization.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of new telomerase RNA genes of *Saccharomyces* species of the “sensu stricto” group.

In order to elucidate the secondary structure of telomerase RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, we identified strains in which the RNA sequences are close enough to allow juxtaposition of homologous regions, but diverge

sufficiently to allow for covariation rates adequate for structural prediction. Based on published sequence similarities, all species from the *Saccharomyces* “sensu stricto” group were selected. These include *S. cerevisiae* S288C and its variant *S. cerevisiae* SK1, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus*. The latter, which is thought to be a natural hybrid between *S. cerevisiae* and *S. bayanus* was included in order to increase sequence variability, thereby increasing chances of covariation [24, 25]. Primary sequences of telomerase RNAs are known to diverge significantly, even between closely related species [20, 21] and a direct amplification of the sequences from the selected species proved unsuccessful. However, protein encoding sequences bordering the *TLC1* loci are more conserved and underlying DNA sequences could be predicted more reliably, particularly for stretches of highly conserved amino acids of the respective proteins [25]. We took advantage of this fact and the relative compactness of yeast genomes to clone the complete *TLC1* loci from all the species mentioned above using this nearest neighbour-based strategy (see Experimental Procedures in Supplemental Materials). The candidate homologues were inserted into pADCEN26, downstream a transcription terminator region of the *ADH1* gene. Constructs containing the various cloned *TLC1* loci were introduced into *S. cerevisiae* which lacked its own *TLC1* gene as well as the *RAD52* gene (Table 1). In this host, a disruption of both telomerase function by a deletion of the *TLC1* gene, and an abolition of the major recombination pathway by deleting *RAD52* leads to

progressive telomere shortening with an incidental loss of viability after 40-50 generations, called senescence [26]. Clearly, except for the locus derived from *S. bayanus*, the genes from *S. cerevisiae* (S288C; positive control, as well as SK1) and the candidate genes derived from *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, and *S. pastorianus* were able to complement the *TLC1* disruption. Plasmid loss experiments confirmed that complementation was dependent on the introduced loci (Table 1). Work from the Lundblad laboratory has shown that the *S. bayanus TLC1* gene, when present on a 2 micron plasmid, can also partially rescue the telomere replication defect of a *S. cerevisiae tlc1-Δ* strain (A. Chappell and V. Lundblad, personal communication). The actual lengths of telomeric repeat tracts were not at the level of wild-type for all clones, suggesting incomplete complementation by some genes. We conclude that the cloned loci of all species can direct transcription of an at least partially complementing RNA in *S. cerevisiae*. Therefore, the heterologously expressed RNAs must mature and fold into a similar structure as the one of the host cells in order to be able to associate with the various endogenous *S. cerevisiae* proteins to form an active RNP.

RNA sizes and the mature 5'- and 3'-ends.

In *S. cerevisiae*, the *TLC1* RNA is present in two distinct forms: a less abundant polyadenylated transcript and a much more abundant non-polyadenylated form of about 1,200 nucleotides (nt) [5, 10]. The non-

polyadenylated species is thought to be the functional RNA present in the RNP and its 3'-end has been mapped to various positions after a Sm-protein binding element ([10, 27] and see below). Taking a previously proposed 5'-end for the *S. cerevisiae* RNA and the completely conserved Sm-binding site as markers, the aligned sequences derived from all species predicted RNA sizes ranging from about 1160 nt (*S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus*) to 1220 nt (*S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, Fig. 1). In order to establish whether such RNAs are indeed expressed in the various species, we performed Northern blots with RNA derived from all the species listed above (Fig. 2). A mix of species-specific probes revealed the presence of a major RNA band in all species and, in some cases, a minor band. The estimated sizes for the major bands coincide well with the predicted sizes derived from the sequencing efforts. We conclude that the cloned sequences are expressed in the particular species as RNAs of the predicted sizes, strongly suggesting that we indeed cloned the genes encoding the functional TLC1 RNAs of the corresponding species.

In order to properly align the telomerase RNA sequences, we mapped the *in vivo* 5'-ends of the TLC1 RNAs by primer extension using total cellular RNA from *S. cerevisiae* (S288C, SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* and *S. kudriavzevii* (example for *S. cerevisiae* is shown in Fig. 3). Primer extensions were performed using species-specific radiolabeled primers that annealed 30-70 nucleotides downstream of the 5' terminus that was previously proposed for the *S. cerevisiae* RNA [5]. Surprisingly, the major

band corresponding to the *S. cerevisiae* RNA 5'-end was mapped to a guanosine residue 10 nucleotides downstream of the previously proposed 5'-end (Fig. 3). The position of this major band representing the mature 5'-end remained unchanged, irrelevant of the position of the primer used (data not shown). Therefore, we designate this nucleotide as the "+1" position of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA. As expected, the major 5'-ends of the *S. paradoxus* and *S. cariocanus* TLC1 RNAs, the sequences of which are highly homologous to that of *S. cerevisiae* in this region, mapped to the same nucleotide position, indicating a conserved mature 5'-end for these three RNA species (Fig. 1 and data not shown). The determined 5'-ends of the *S. mikatae* and *S. kudriavzevii* RNAs are 17 and 20 nucleotides upstream with respect to the *S. cerevisiae* 5'-end. Curiously, in *S. cerevisiae*, a minor fraction of the TLC1 RNA molecules also has extended 5'-ends (lane 4, Fig. 3). It remains to be established whether these molecules are mature TMG-capped RNAs or potential processing intermediates. Inclusion of the extra nucleotides did not influence the overall folding of the complete RNA molecule derived from any of the species and for simplicity reasons, they were not incorporated in the structure proposed below. The 3' terminus of *S. cerevisiae* TLC1 RNA was previously shown to be located downstream the Sm-binding site [10, 27]. In order to compare the 3'-ends of *S. cerevisiae* with those of other species, we performed 3'-end mappings using RNase protection assays. The RNA probe covered the region from 61 nt upstream to 295 nt downstream relative to the *S. cerevisiae* Sm-site. As previously observed by

similar RNase protection assays [27], the major 3'-end of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA is located in a run of uridine residues, about 10 nucleotides downstream of the Sm-site (Fig. 1 and data not shown). However, we also detected minor bands indicating the presence of additional 3'-ends about 80 nucleotides further downstream (data not shown). These positions are consistent with previous 3'-end determinations using an RT-PCR method [10], and also with the sequences retrieved originally on cDNA clones [5]. The sequence around the Sm-site is 100% conserved in all species analyzed here, such that the alignment of the 3'-ends at this site can be made with high confidence. Therefore, we aligned the sequences at this major 3'-end located about 10 bases downstream of the Sm-binding site for the prediction of the conserved TLC1 structure. In order to investigate the impact of the ~ 80 nucleotide-extension downstream of the Sm-site, we independently folded the RNAs containing such an extension. This analysis demonstrated that the 3'-extension can fold into what appears to be an independent conserved structure by itself, but which does not influence or change the folding of the global structure reported in figure 4 (data not shown).

Taken together, our data establish the mature 5'-end of the TLC1 RNA and suggest that a major 3'-end is located about 10 nucleotides downstream of the conserved Sm-site. These anchor points allowed a robust sequence alignment of all RNAs and formed the basis for the structure prediction.

Establishment of a secondary structure model based on phylogenetic analysis.

In order to derive a secondary structure for the yeast telomerase RNA, we followed an iterative procedure consisting of sequence alignment, a computer-aided folding that predicts thermodynamically stable helices, and covariation searches (see Experimental Procedures). The overall similarities between the various RNAs and that of *S. cerevisiae* S288C ranged in between 59% (*S. pastorianus*) and 98% (*S. cerevisiae* SK1), which is within the optimal range for performing phylogenetic comparative analyses (Fig. 1 and Supplemental Table S1). We note that this primary sequence divergence of the TLC1 RNAs of the species in the “sensu stricto” group is comparable to existing data on these species [24, 25]. Thus, the TLC1 sequences determined here are consistent with the notion that *S. cerevisiae* is about equidistant to *S. bayanus* and *S. pastorianus*. While this work was in progress, whole genome sequences of two distantly related “sensu lato” yeasts became available (*S. kluyveri* and *S. castellii* [25]). In order to determine the extent of homology between the “sensu stricto” and “sensu lato” telomerase RNA sequences, we searched for homologues in these genomes using conserved sequence elements described above, including the predicted template sequences. We were able to identify a potential sequence for the *S. castellii* TLC1 RNA, but due to the increased primary sequence divergence, a reliable sequence alignment for the complete RNA was not possible (data not shown). In addition, chromosomal synteny in the region of *TLC1* is not maintained

between the “sensu stricto” and “sensu lato” species and therefore, a cloning approach using the nearest neighbour was not feasible for the other “sensu lato” species. This suggests that attempts to enhance the confidence of phylogenetic analyses on the predicted secondary structure of the TLC1 RNA for *Saccharomyces* species will require the identification of sequences in new “sensu stricto” variants or species or in depth biochemical mappings.

The overall predicted structure of the RNA comprises seven major helical domains organized around a central multi-branched loop (Figs. 4 and 5); designated I through VII. Helices I to VI emerge directly from the central loop, while domain VII is linked to domain I by a short single-stranded region. The 5' and 3'-ends of the RNAs are predicted to be in close vicinity, which is typical for non-coding yeast RNAs [28]. Helical segments within a domain can be considered very likely to exist if covariation is found for two or more base pairs within the given helix [17, 18]. Based on these criteria, the existence of 10 of the predicted 15 helices is well supported by covariation analysis (Table 2). Helix I is unusually long and unlikely to be organized in a linear fashion as drawn out here. Upon inspection of the sequences involved in the formation of this helix, we noticed stretches with highly differing degrees of either primary sequence conservation or occurrence of covariations (Fig. 4). As a first approximation, we divided helix I into 3 segments (Fig. 5): the sequences making up segment A are highly conserved, predicting a conserved function. Segment C is less conserved, but does not include significant instances of covariation. In contrast, segment B is made up of many variable nucleotides

and contains 13 covarying base pairs (bp) over the stretch of 43 bp (for *S. cerevisiae*, Figs. 4, 5). Therefore, the helical nature of segment B is extremely well supported by the covariation analysis. In our model, we retain segments A and C as helices only because we could not obtain evidence supporting an alternative structure. Three of the non-supported helices (stems III, IVb and VI) include sequences that are highly conserved ($\geq 50\%$ complete sequence conservation, see Fig. 4). This very high conservation may suggest a conserved function, but in the absence of covariation, it cannot be distinguished whether the function is supported by the predicted structure, a different structure, or a primary sequence. Other unsupported stems include VIIc and VIId, which reside in close proximity to each other and their structure thus at this point also remained unclear (Figs. 4, 5).

In order to clarify some of these uncertainties and to directly test the capacity of the RNA to fold in vitro, we probed in vitro transcribed TLC1 RNA of *S. cerevisiae* S288C for RNase H accessibility using specific DNA oligonucleotides targeting selected regions on the RNA. The premise of this approach is that single-stranded regions will be accessible to binding by oligonucleotide probes, leading to RNase H-dependent cleavage, while helical regions will not. We first probed two regions of almost certain structure to evaluate the fidelity of the approach and to establish controls for the quality of the RNase H cleavage reaction. The template region was chosen as a positive control for cleavage. This region is likely to be single-stranded as it must be accessible for the association with telomeric DNA, and for other

telomerase RNAs, the region was previously shown to be single-stranded in vivo [19]. As negative control, we directed an oligonucleotide to helical region IIa, a short template-proximal stem that is involved in a template boundary function [14]. As predicted, the template region of TLC1 RNA was fully accessible to oligonucleotide hybridization and RNase H cleavage, even after RNA renaturation (oligo RH459, Fig. 5). In contrast, helix IIa was only appreciably cleaved when the RNA was denatured (oligo RH133, Fig. 5). The clean cleavage patterns observed with these limited control sites also suggested that the in vitro RNA folding produces a fairly homogeneous RNA structure. Complementary oligonucleotides targeting specific other regions of the RNA were thus used in subsequent RNase H experiments as outlined on the predicted structure in Fig. 5 (cleavage patterns at selected sites are shown in Fig. 5B, and data not shown). Since the RNase H accessibility experiments were performed on in vitro transcribed and folded RNA, they do not necessarily provide direct indications for the presence or the absence of a given structure by themselves. However, in the context of the predicted structure that is supported by phylogenetic analyses, such experiments can lend strong support for the proposed structure. More importantly, a disagreement between the biochemical and phylogenetic data flags problematic regions that need to be analyzed further.

In our prediction of the secondary structure of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA, there is an almost perfect correlation between sequences predicted to be in helices by covariation and relative inaccessibility of such strands to RNase H

mapping. Interestingly, all helices which were established by previous genetic experiments are indeed helices by our analyses. Such areas include a conserved bulged stem (IVc), the structure of which has been shown to be important for association of an essential factor for in vivo telomerase activity (Est1p, [13]). Resistance of the conserved stem IIa, a boundary element for telomerase-mediated reverse transcription [14, 29], is discussed above. The analyses here also show covariation and RNase H support for the predicted stem IIc. Previous analyses of this area strongly suggested a helix and this stem was later shown to be important for Ku-protein binding and telomerase recruitment [15, 16].

The predicted terminal loop on stem VIIId is clearly accessible to the mapping while stems VIIb and VIIa adjacent are not (RH1059, RH1009 and RH980, Fig. 5). Thus, while our data do not prove the precise organization of the region around stems VIIb-d, they are consistent with the organization presented.

A special case was found to be present on the terminal loops of stems V and VI (locations RH717, RH740, RH761 and RH765, Fig. 5A). These loops are predicted to be single-stranded but clearly, the left sides of both loops are relatively inaccessible to RNase H probing (Fig. 5B). At least for the loop of stem VI, this inaccessibility is unlikely due to a general occlusion of the site for oligonucleotide or enzyme access, since an oligonucleotide targeting the right side of loop VI directs quite efficient RNase H-mediated cleavage (oligo RH765, Fig. 5B). Upon further inspection of the sequences in these loops, we

noted an almost perfect complementarity between sequences overlapping those targeted by RH717 and RH761. In addition, this complementarity is highly conserved in the TLC1 sequences from all species analyzed here (see Figs. 1 and 4). It is therefore tempting to speculate that these loops interact with each other to form a tertiary interaction. Intriguingly, this pseudoknot structure would lie in an area that was previously shown to interact with the catalytic subunit of the yeast telomerase (Est2p, [12]). A pseudoknotted structure in the vicinity of the predicted catalytic center comprising the template region is also a conserved element for vertebrate and ciliate telomerase RNAs [20, 23, 30]. Furthermore, a similar pseudoknot at a presumably analogous position was found to be an essential element for the function of *K. lactis* telomerase RNA [31]. Given that the yeast Est2p protein clearly has recognizable similarities to catalytic subunits of telomerases in other organisms [3], it would make sense that the associated RNAs would also display similarities. Thus, our structure is also consistent with the presence of a tertiary RNA interaction forming a pseudoknot in the area of TERT/Est2p interaction. In the *Saccharomyces* RNAs, this pseudoknot could be formed by an interaction of the terminal loops of stems V and VI.

Overall, the predicted structure could be divided into at least three functional regions: First, the central core which may include the template region and stems III, IVa-c, V and VI. This element would associate with the core proteins for enzymatic activity in vivo (Est2p, Est1p and perhaps others). It would also include a potential pseudoknot and a template boundary element (proximal

part of stem IIa, [14]). A second region involves stems IIa-d. The distal end of this domain has been shown to be associated with the yeast Ku-proteins and a terminal deletion of that stem IIc is tolerated, but produces short telomeres [16]. Clearly, there is variability around the stems IIb and IId with some yeast species probably having additional stems (IIb_1 and IId_1, see insets Fig. 4). The complete area that includes stems IIc, IId and IId_1 was deleted from the *S. cerevisiae* molecule and in a separate experiment, stem IIb was also removed. For both cases, the remaining molecules complemented a *TLC1* deletion (data not shown). Thus, as proposed previously, the distal areas of stems IIb-d are non-essential but could function as recruitment domain via the Ku-proteins [15]. The third region (stems VIIa-c and the single-stranded 3'-end) is separated from the first area by quite a large domain (stem I), which probably has functional sub-elements. From deletion studies, there is evidence that this third area is also non-essential [12]. However, a region in the telomerase RNA of *K. lactis* and which could be analogous to stems VII appears essential for *K. lactis* telomerase function [32]. Finally, the distal most 3'-end region, which includes the Sm-binding site, clearly influences the stability of the RNA [11]. In addition, the existence of RNAs with extensions of up to 80 nt downstream of the major 3'-end near the Sm-site suggests additional, and as yet unknown processing events. It remains to be determined whether the rest of area three also contributes to RNA stability or whether this region is involved in other aspects of RNP function. For example,

the mature yeast RNP is thought to function as a dimer [33], but the region(s) on the TLC1 RNA contributing to this multimerization are unknown.

At least certain parts of the structural elements of the yeast telomerase RNA could be non-essential [12, 32]. Precedence for an addition of large, yeast-specific and non-essential sequences to otherwise conserved non-coding RNAs is also provided by the spliceosomal U1 and U2 snRNAs [34-37]. Much of the yeast U1 and U2 snRNA sequences are dispensable for function and homologous sequences are absent from the vertebrate snRNAs. However, an important functional domain of the yeast U1 snRNA folds into a structure that is highly similar to that of the vertebrate RNA [34, 36]. Given the detailed structural organization of the yeast telomerase RNA presented here, it will be interesting to determine whether a much smaller functional RNA with conserved structural domains can be derived.

CONCLUSIONS

We present a detailed working secondary structure model for the large *S. cerevisiae* telomerase RNA. The structure suggests sub-elements with functional similarities to the vertebrate and ciliate RNAs, as well as yeast specific elements. The prediction now allows for a detailed molecular genetic and biochemical analysis of the telomerase RNP in a genetically tractable system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast manipulations, analyses of nucleic acids and PCR conditions for isolating *TLC1* homologues from the various yeast species used standard procedures (see Supplemental Material for a detailed description).

Phylogenetic analysis and helix nomenclature

Telomerase RNA sequences were aligned using the computer program ClustalW with manual corrections. Segments of highly conserved regions were used as anchors for alignment. Putative helices were identified by visual search of covarying paired residues [17, 38, 39]. We considered a single base pair position as covarying, if: (1) the helix in which the base pair resides is provided by complementary sequences present in homologous segments of all molecules inspected; (2) using at least 6 out of the 8 molecules, two independent compensatory changes restoring usual pairings can be specified (canonical and wobble: G-C, A-U and G · U). Multiple covariations at a single base pair position are only counted as one covariation such that the total number of covariations in a given helix is always \leq helix length in bp. The presence of two or more covariations within a potential helix was accepted as a strong indication for the existence of that particular helix [17]. The phylogenetic analysis was aided by the use of X2s, an algorithm that identifies compensatory base changes in a set of properly aligned sequences [40], in conjunction with mFold, an RNA folding program based on lowest free-energy estimates of helix stability [41, 42]. Data from previously characterized

structures were integrated in the initial analysis, allowing optimization of the structure. Where no conserved structure was possible, the RNA is either left single-stranded or is drawn out as proposed by mFold. Helices were numbered from 5' to 3' in order of their occurrence and the numbering was increased by one upon each passage of a multibranched loop, a pseudoknot loop or a single-stranded region that does not form a loop. Helical segments separated only by internal loops (bulges) are considered to belong to the same helix. In the case of helices not belonging to the core structure, but specific to certain species (Fig. 4), an underscore and a number are appended to the number of the preceding helix.

Site-specific RNase H cleavage assay.

The DNA fragment for in vitro transcription of TLC1 RNA with the T7 MEGAscript transcription kit (Ambion) was obtained by PCR amplification using oligonucleotides TLC1T7F and TLC1R (Supplemental Table S3) and plasmid pADCEN36. RNase H cleavage was performed using DNA oligonucleotides complementary to indicated regions of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA (Fig. 5; Supplemental Table S3). The RNA substrate was heat-denatured and renatured in cold folding buffer. The reaction mixture was incubated for 2 min on ice and for 30 min at 30°C. Prewarmed RNase H buffer, the specific probe and 1.25U of RNase H (USB) were added and the reaction mix incubated for 10 min at 30°C. Cleavage reactions were terminated by freezing in dry ice followed by heating to 90°C for 1 min. RNase

H treated TLC1 RNA was directly analyzed on a RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Chips and samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Quantitative RNA detection by laser induced fluorescence is usually documented by an electrophoregram, which then is converted and displayed as a gel-like image.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Greider and D. Gottschling for strains; particularly E. Louis and J. Piskur for providing “sensu stricto” as well as “sensu lato” strains and useful discussions. S. Metaoui and F. Madore provided expert informatics support. We also thank D. Zappulla and V. Lundblad for discussing results prior to publication. This work was supported by grants of the Canadian Cancer Society (NCIC; 013235) to RJW, of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP67162) to SAE, and a core group grant of the CIHR (GRP86284). RJW is a Chercheur-National and SAE a Chercheur-Boursier of the Fonds de Recherche en Santé du Quebec (FRSQ).

REFERENCES

1. Chan, S.W., and Blackburn, E.H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21, 553-563.
2. de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
3. Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561-567.
4. Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., and Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem. Sci.* 27, 572-579.
5. Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
6. Chen, J.L., and Greider, C.W. (2004). Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem. Sci.* 29, 183-192.
7. Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E.H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546-552.
8. Taggart, A.K., and Zakian, V.A. (2003). Telomerase: what are the Est proteins doing? *Curr. Op. Cell Biol.* 15, 275-280.
9. Lundblad, V. (2003). Telomere replication: an est fest. *Curr. Biol.* 13, R439-441.
10. Chapon, C., Cech, T.R., and Zaug, A.J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* 3, 1337-1351.
11. Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., and Cech, T.R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.
12. Livengood, A.J., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2366-2374.
13. Seto, A.G., Livengood, A.J., Tzfati, Y., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev.* 16, 2800-2812.
14. Seto, A.G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaug, A.J., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2003). A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *Rna* 9, 1323-1332.
15. Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 17, 2384-2395.
16. Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., and Gottschling, D.E.

- (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat. Genet.* 27, 64-67.
17. Pace, N.R., Smith, D.K., Olsen, G.J., and James, B.D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA--a review. *Gene* 82, 65-75.
 18. James, B.D., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1989). Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods Enzymol.* 180, 227-239.
 19. Zaug, A.J., and Cech, T.R. (1995). Analysis of the structure of *Tetrahymena* nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *Rna* 1, 363-374.
 20. Chen, J.L., Blasco, M.A., and Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-514.
 21. Romero, D.P., and Blackburn, E.H. (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343-353.
 22. Lingner, J., Hendrick, L.L., and Cech, T.R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.* 8, 1984-1998.
 23. ten Dam, E., van Belkum, A., and Pleij, K. (1991). A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 6951.
 24. Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, 451-454.
 25. Cliften, P.F., Hillier, L.W., Fulton, L., Graves, T., Miner, T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Johnston, M. (2001). Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res.* 11, 1175-1186.
 26. Lundblad, V., and Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.
 27. Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., and Lue, N.F. (2003). Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 3882-3890.
 28. Yeh, L.C., and Lee, J.C. (1992). Structure analysis of the 5' external transcribed spacer of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 228, 827-839.
 29. Tzfati, Y., Fulton, T.B., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* 288, 863-867.
 30. Collins, K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 187-218.
 31. Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes Dev.* 17, 1779-1788.

32. Roy, J., Fulton, T.B., and Blackburn, E.H. (1998). Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev.* 12, 3286-3300.
33. Prescott, J., and Blackburn, E.H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev.* 11, 2790-2800.
34. Kretzner, L., Krol, A., and Rosbash, M. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* U1 small nuclear RNA secondary structure contains both universal and yeast-specific domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 851-855.
35. Igel, A.H., and Ares, M., Jr. (1988). Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing. *Nature* 334, 450-453.
36. Collins, C.A., and Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat. Struct. Biol.* 7, 850-854.
37. Shuster, E.O., and Guthrie, C. (1988). Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides. *Cell* 55, 41-48.
38. Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47, 621-669.
39. Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10-26.
40. Juan, V., and Wilson, C. (1999). RNA secondary structure prediction based on free energy and phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 935-947.
41. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940.
42. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1: Sequence alignment and consensus of telomerase RNA sequences of the *Saccharomyces* “sensu stricto” complex.

The sequences of telomerase RNAs from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Sbay) and *S. pastorianus* (Spas) were aligned as described in the text. Dashes (-) denote gaps introduced within the alignment. The major transcription initiation site determined in Scec is indicated by “+1”. The numbering, marked with underscores every tenth nucleotide above the alignment is according to telomerase RNA sequence from Scec. The RNAs terminate ~10 nucleotides downstream of the Sm site and the total number of nucleotides for the individual RNAs is indicated at the end of the respective sequence. In the consensus sequence (line: Cons), invariant residues for all species are denoted by uppercase letters; lowercase letters indicate nucleotides conserved among 85% of the species; dots represent variable nucleotides. Nucleotides determining complementary strands of proposed helices (line: Helices) are delineated with brackets enclosing the respective helix identification as well as forward or backward arrowheads denoting 5' or 3' strands respectively. The consensus sequences of the template region and the Sm motif are underlined and labelled.

Figure 2: Size estimation of TLC1 RNA homologues.

Total RNA isolated from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud) and *S. bayanus* (Sbay) was subjected to Northern blot analysis using species-specific probes. TLC1 RNA species in *S. cerevisiae* S288C and a size marker (M) position are indicated.

Figure 3: The major 5'-end of the TLC1 RNA in *S. cerevisiae*.

Oligonucleotide PXCER23 complementary to nucleotides 23 to 39 was used for primer extension analysis of telomerase RNA of *S. cerevisiae* S288C strains containing a wild-type *TLC1* gene (lane 4), or harbouring a deletion of the *TLC1* gene (lane 3). For the sequencing reactions, the cloned *TLC1* gene was used as template. Solid arrow denotes the major 5' end. Open arrows denote TLC1 RNA species with additional 5'-extensions. Reactions were also performed without RNA (lane 1) or in presence of an in vitro generated TLC1 transcript starting 122 nucleotides upstream the major in vivo 5' end (lane 2).

Figure 4: Minimum consensus structure of telomerase RNA in species of the *Saccharomyces* “sensu stricto” complex.

The conserved core incorporates only consensus nucleotides that were identifiable in all the molecules inspected. Symbols used are defined in the key in the lower left. The template region and the Sm-motif are labelled and their consensus nucleotides are bracketed. Simplified drawings corresponding to structures for *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* and *S. bayanus* indicating certain species-specific differences are outlined in the lower right. Letters A, B, C on stem I indicate a possible sub-division of stem I (see text).

Figure 5: Secondary structure model of telomerase RNA of *S. cerevisiae* based on phylogenetic comparison and RNase H probing.

(A) The secondary structure model was established by comparative phylogenetic analyses in conjunction with RNase H probing data. Symbols used are defined in the key in the lower left. Helical domains are numbered from 5' to 3' in their order of occurrence as I to VII. The template region and the Sm motif are labelled and the consensus nucleotides are bracketed. Positions are referred to by nucleotide positions, using +1 as defined in Fig. 3. Sites targeted by complementary DNA oligonucleotides in RNase H experiments are indicated with an arrow.

(B) In vitro susceptibility of TLC1 RNA to oligonucleotide/RNase H cleavage. The synthetic TLC1 RNA transcript was submitted to RNase H treatment in denaturing conditions (D) or after renaturation (R) and the cleavage products were fractionated on a RNA 6000 Nano LabChip. Typical examples of TLC1 RNA probings are shown in the gel-like image. The input (lane 1) represents 1.4 pmole of TLC1 RNA mock-treated in the absence of any oligonucleotide. Probe RH459 (lanes 2 and 3), which is complementary to the single-stranded template region is used as positive control (>60% cleavage in renatured conditions). Probe RH133 (lanes 4 and 5) which targets the template boundary element, a previously characterized helical structure, is used as negative control (<10% cleavage in renatured conditions). RH717 (lane 6) and RH761 (lane 8) are directed to interacting loops of the putative pseudo-knot I and produce little to moderate cleavage. Probe RH740 (lane 7) does not cleave the predicted, but not phylogenetically supported stem of helix VI. RNA size markers (M) are indicated on the left. Close triangle: unreacted input RNA (~1159 nt). Open triangle: RNA loading control. Note that lane 4 is slightly overexposed. For precise positions of all oligonucleotides used in the RNase H experiments, see Supplemental Table S3.

TABLES

Table 1. Complementation of a *TLC1* disruption in *S. cerevisiae* S288C by *TLC1* loci from the “sensu stricto” species.

Gen. of growth	Cells grown on:							
	YC-TRP-LEU-URA					FOA	YC-TRP-LEU	
	20G	40G	60G	80G	100G	120G 20G ^a	140G 40G ^a	160G 60G ^a
<i>S. cer.</i> S288C pADCEN36	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cer.</i> SK1 pADCEN35	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. paradoxus</i> pADCEN42	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cariocanus</i> pADCEN43	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. mikatae</i> pADCEN44	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. kudriavzevii</i> pADCEN45	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. bayanus</i> pADCEN46	++	+	+/-	-				
<i>S. pastorianus</i> pADCEN49	++	++	++	++	++	+/-	-	
None pADCEN26	+	+/-	-					

S. cerevisiae strains (CSHY76) lacking the *TLC1* and *RAD52* genes and bearing the indicated plasmids (left most column) were grown for 100 generations on YC-TRP-LEU-URA medium to determine the ability of the *TLC1* homologue-containing vector to complement senescence. Two independent transformants were selected for each *TLC1* homologue. Subsequent growth on 5-FOA medium and on YC-LEU-TRP medium established plasmid-dependence for survival. Plasmid pADCEN36 is used as positive control. Empty plasmid pADCEN26 is used as negative control. Viability is scored based on colony size after 3 days; ++: growth rate similar to that of the positive control; - : absence of growth; +/- : intermediate growth. a: Generations after loss of plasmid.

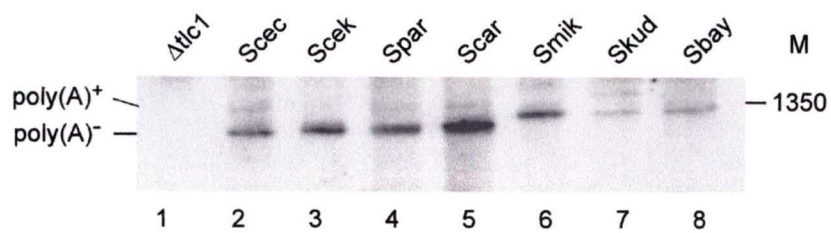
Table 2. Base pairings in the TLC1 RNA secondary structure model.

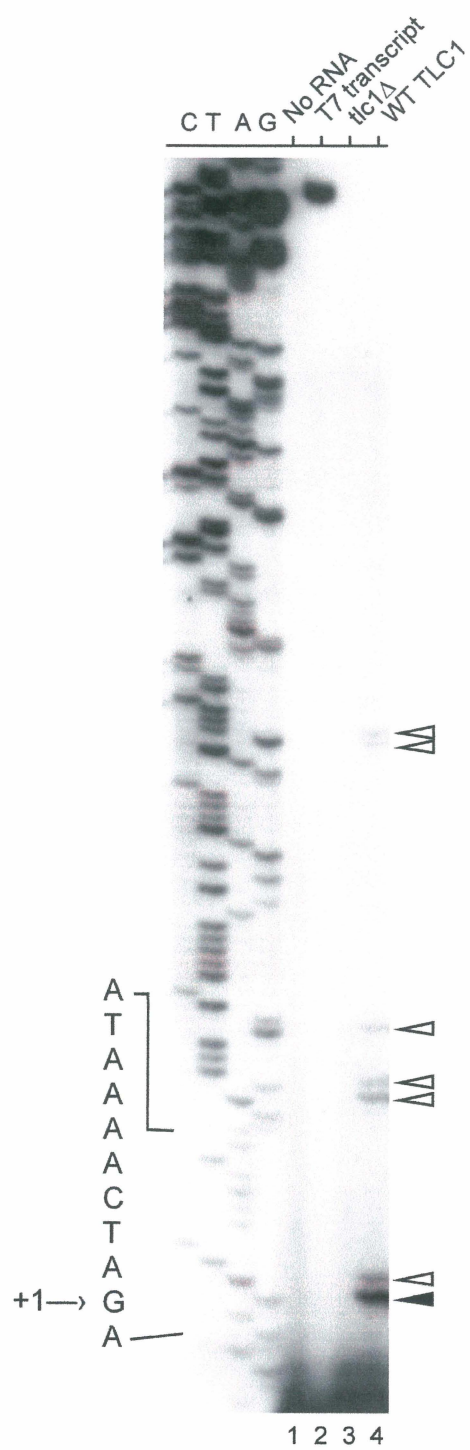
Paired Regions			No of base pair positions displaying covariation ^c	No of base pair positions 100% Conserved	Number of base pair positions with G/C to G/U or A/U to G/U changes ^c
Helix Number ^a	Nucleotide Positions ^b	Length (bp)			
I	7-126/805-909	86	16 (19%)	20 (23%)	16 (19%)
IIa	132-176/409-456	32	5 (16%)	10 (31%)	11 (34%)
IIb	185-210/214-241	22	3 (13%)	2 (9%)	4 (18%)
IIb_1 ^d	252-256/404-408	5	0	0	0
IIc	263-297/305-334	27	6 (22%)	8 (30%)	5 (18%)
IId	337-346/351-359	7	3 (43%)	0	1 (14%)
IId_1 ^e	366-381/386-400	10	0	0	0
III	484-489/495-500	6	0	3 (50%)	4 (67%)
IVa	504-543/666-704	30	7 (23%)	1 (3%)	8 (27%)
IVb	554-567/574-587	13	0	7 (54%)	3 (23%)
IVc	589-621/625-660	26	6 (23%)	12 (46%)	5 (19%)
V	707-714/731-738	8	2 (25%)	1 (12%)	5 (63%)
VI	741-757/780-802	17	0	12 (71%)	1 (6%)
VIIa	912-976/1077-1133	42	5 (12%)	7 (17%)	5 (12%)
VIIb	977-1000/1005-1027	19	4 (21%)	6 (32%)	3 (16%)
VIIc	1028-1036/1041-1049	8	0	2 (25%)	1 (13%)
VIIId	1056-1062/1069-1075	6	1 (17%)	1 (17%)	4 (67%)
P knot II	715-722/761-768	8	0	5 (63%)	2 (25%)

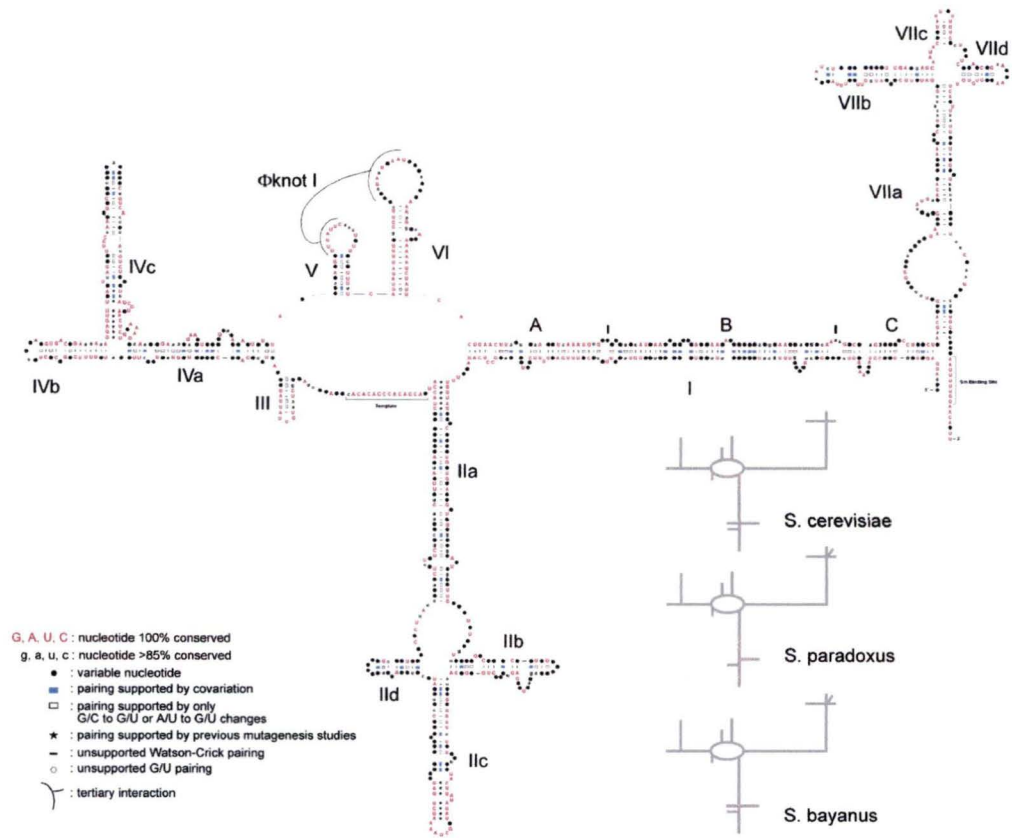
^aHelix numbers are from Figs. 1 and 5. ^bPositions refer to +1 as defined in Figs. 1 and 3.

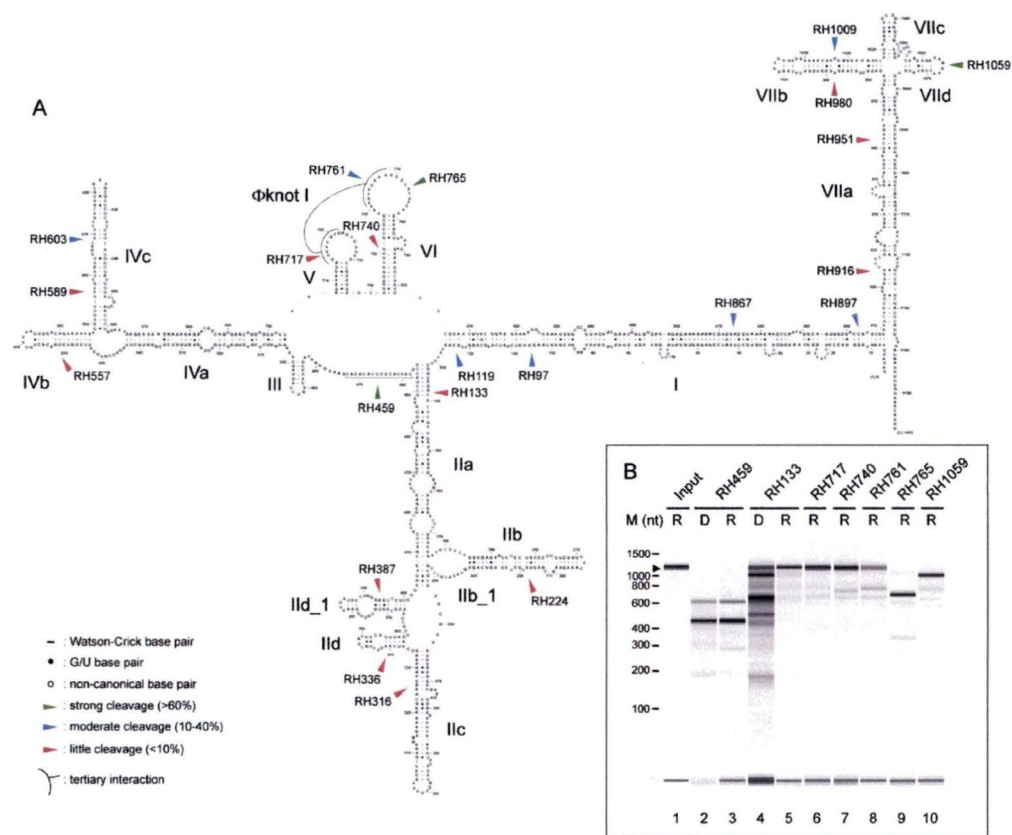
^cFor details of covariation determination see Material and Methods. ^dThis helix is not present in *S. pastorianus*. ^eThis helix is not present in *S. paradoxus* and *S. cariocanus*.

[illegible]









Supplemental Material for Dandjinou et al.: A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA.

DETAILED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast species and nucleic acids

The yeast strains used in this work are listed in Supplemental Table S2. Yeast transformations were performed using the LiAc/ssDNA/PEG method as described in [1]. Haploid yeast strains were generated by sporulation in 0.5% KOAc at 26°C, followed by tetrad dissection. For all haploid cell analyses, strains were derived from four tetrads that showed the expected 2:2 segregation patterns. Genomic DNAs for PCR amplifications of *TLC1* loci from “sensu stricto” species were isolated using a CsCl-method as described previously [2]. Genomic DNA for Southern blot analysis was isolated using a glass bead method [3]. RNA extractions were as described previously [4]. PCR reactions were carried out on a Techgene thermal cycler. Oligonucleotides used in this work are listed in Supplemental Table S3.

PCR amplification, plasmid construction and sequencing

For cloning of the *TLC1* loci, initial rounds of PCR amplifications were performed using oligonucleotides designed to hybridize in the vicinity of the *TLC1* gene. The *S. cerevisiae* genes *PDX3* and *CSG2* flank the *TLC1* gene and homologues can be found in more distant hemiascomycetous yeasts (Genolevures online Database: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). Therefore, we reasoned that such genes would be present in all species of the “sensu

stricto" complex, which are the yeast species most closely related to *S. cerevisiae*. Moreover, chromosomal synteny between species of this group is very high and we assumed it was maintained around the *TLC1* locus. Thus, based on highly conserved sequences of *PDX3* and *CSG2* genes, forward and reverse primers were designed. PCR fragments were cloned, sequenced and new primers, now specific for each species, were subsequently designed such as to amplify full-length candidate *TLC1* homologues. The primer pairs used in a final round of PCR can be found in the Supplemental Table S3. Each 25- μ l reaction contained 10 mM Tris-Cl, pH 8.8, 25 mM KCl, 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM each dNTP, 1.5-2.5 U Pwo polymerase (Roche), 20 pmol of each primer and 50 ng of genomic DNA from the appropriate species. Amplification was carried out with 1 cycle at 94°C for 2 min, 35 cycles at 94°C for 15 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 2 min, and one final cycle at 72°C for 5 min. Reaction products were digested using unique restriction enzyme sites added to each primer, gel-purified using QIAquick gel extraction kits and cloned into pADCEN26. pADCEN26 is derived from pRS316, into which a 327-bp fragment containing the transcription terminator region of the *ADH1* gene was inserted [5, 6].

Candidate telomerase RNA loci from *S. cerevisiae* (S288C), *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* were cloned into pADCEN26 to generate plasmids pADCEN36, pADCEN35, pADCEN42, pADCEN43, pADCEN44 pADCEN45, pADCEN46, pADCEN49, respectively. For each locus, both strands of inserts

derived from two independent PCR reactions and clones were sequenced. The *TLC1* nucleotide sequence data for *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus*, and *S. bayanus* reported in this article were deposited in GenBank.

Primer extensions

Approximately 2 pmol of radiolabeled oligonucleotide primer complementary to nucleotides 33-49 or 52-68 relative to the previously proposed 5' end of the *S. cerevisiae* *TLC1* RNA or to homologous regions of the other *Saccharomyces* RNAs were annealed to 5-15 µg of total yeast RNA at 37°C and extended with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche) at 42°C. Products were analyzed by PAGE. The same primers were used to determine the positions of the primer extension stops by direct comparison with dideoxynucleotide chain termination reactions on the appropriate genomic clone on the same gel. As a positive control for reverse transcriptase activity, an in vitro generated sense RNA starting at position -122 in the *S. cerevisiae* *TLC1* locus was used.

RNA transcription, site-specific oligonucleotide/RNase H cleavage and capillary electrophoresis on a chip.

The DNA fragments for in vitro transcription of *TLC1* RNA were obtained by PCR amplification of plasmid pADCEN36 using oligonucleotides *TLC1*T7F and *TLC1*R (Supplemental Table S3). The fragment of the expected size was

gel-purified and then used to generate TLC1 RNA with the T7 MEGAscript transcription kit (Ambion). The TLC1 RNA transcript was phenol/chloroform extracted, isopropanol precipitated and resuspended in water at a final concentration of 6 pmol/ μ l (~2 μ g/ μ l).

RNase H cleavage was performed using DNA oligonucleotides complementary to indicated regions of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA (Fig. 5; Supplemental Table S3). The TLC1 RNA substrate was heated to 90°C for 1 min and 1.25 μ l (1.4 pmol, ~500 ng) of denatured RNA was added to 1.25 μ l of cold folding buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 2 mM DTT). The reaction mixture was incubated for 2 min on ice and for 30 min at 30°C. 2.5 μ l of prewarmed RNase H buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM DTT), 1.4 pmol of oligo probe and 1.25U of RNase H (USB) was added and the reaction mix incubated for 10 min at 30°C.

Cleavage reactions were terminated by freezing in dry ice followed by heating to 90°C for 1 min. Three control reactions were routinely performed for all series of experiments: a) omitting a DNA oligonucleotide from the reaction; b) using a DNA oligonucleotide targeting a well characterized helical region (reduced accessibility; for example proximal portion of stem IIa, see text); c) using a DNA oligonucleotide targeting the single-stranded template region (full accessibility).

RNase H treated TLC1 RNA was directly analyzed on a RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Chips and samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Briefly, the gel matrix was

prepared by adding 1 µl of provided dye to 65 µl of gel and the gel/dye mixture was filtered. 9 µl of gel/dye mixture were successively loaded into the priming well and into the buffer wells. 5 µl of RNA 6000 Nano marker were loaded in sample and ladder wells followed by addition of 1 µl of denatured ladder and 1 µl of the cleavage reaction mix (0.25 pmol \leq 100 ng RNA). The chip was vortexed and placed in the Agilent 2100 Bioanalyzer for capillary electrophoresis. Quantitative RNA detection by laser induced fluorescence is usually documented by an electrophoregram, which then is converted and displayed as a gel-like image.

Senescence assays and telomere length analysis

Diploid strain CSHY76, in which one copy of the *TLC1* and *RAD52* genes were replaced by *LEU2* and *TRP1* genes respectively [15], was transformed with plasmids containing candidate *TLC1* homologues (pADCEN36, pADCEN35, pADCEN42, pADCEN43, pADCEN44 pADCEN45, pADCEN46, pADCEN49) or an empty plasmid (pADCEN26). After sporulation and tetrad dissection, single spores carrying a homologue-containing plasmid were restreaked on medium lacking uracil to assay for rescue of senescence. Single colonies from non-senescent strains were picked after 100 generations and streaked on 5-FOA (5-Fluoro-orotic acid) medium to select for cells that had lost the complementing plasmid [16]. Such cells were then successively restreaked to assay for senescence and confirm plasmid dependent survival. In parallel, single colonies transformed with candidate telomerase RNA genes

were picked 20, 40, 60, 80 and 100 generations after sporulation and grown for ~10 generations in 5 ml of medium lacking uracil. Cells were harvested, genomic DNA isolated and digested with XhoI. 1 µg of the XhoI-digested DNA was separated on a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Amersham Hybond-N+) by capillarity. The appropriate bands were visualized by hybridization at 42°C with a random-primed telomeric probe.

Northern blot analysis

15 µg of RNA derived from appropriate cultures were separated on a 4% acrylamide/8M urea gel and electroblotted to a nylon membrane (Amersham Hybond-N+). Blots were UV irradiated, stained with methylene blue to locate 18 and 25S rRNAs [17], and then probed with random-prime labelled fragments that specifically detect the appropriate *TLC1* homologue.

Supplemental Tables:

Supplemental Table S1. Pairwise comparisons of the telomerase RNA sequences derived from *Saccharomyces* “sensu stricto” species.

	S288C	SK1	S. para.	S. cari.	S. mika.	S. kudr.	S. bay.	S. past.
S288C	-	0.977	0.783	0.777	0.702	0.656	0.590	0.589
SK1	18	-	0.78	0.772	0.699	0.649	0.589	0.586
S. para	187	187	-	0.945	0.748	0.682	0.628	0.586
S. cari.	192	195	59	-	0.747	0.682	0.629	0.618
S. mika.	276	280	236	239	-	0.703	0.632	0.618
S. kudr.	321	326	301	303	312	-	0.653	0.644
S. bay.	367	365	336	336	354	333	-	0.895
S. past.	351	355	328	333	353	326	106	-

The upper right half of the table indicates homology values for pairwise comparisons. H value = matches/(matches + mismatches + gaps)/2 [18]. Matches, mismatches and gaps are based on the primary sequence alignment of all telomerase RNA sequences in Fig. 1. The lower left half of the table indicates absolute numbers of mismatches (nucleotide distances).

Supplemental Table S2. Yeast strains used in this study

Species	Designation	Relevant Genotype	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CSHY76	<i>Mata/Mataα</i> <i>ade2/ade2 ura3/ura3</i> <i>leu2/leu2 his3/his3</i> <i>trp1/trp1</i> <i>tlc1::LEU2/TLC1</i> <i>rad52::TRP1/RAD52</i>	C. Greider (Baltimore, USA) [15]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C (BY)	<i>Mata ade2 his3 leu2</i> <i>lys2 met1 trp1 ura3</i>	D. Gottschling (Seattle, USA) [19]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SK1	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CBS 432	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	UFRJ 50791	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces mikatae</i>	IFO 1815	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	IFO 1802	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 7001	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6560	<i>Mata/Mataα</i>	E. Louis (Leicester, UK) [20, 21]

Supplemental Table S3. Synthetic oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence (5'→3')
CERPD ₃ ^a	GGGTAC <u>ACTAGT</u> AGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
CERCSG ₂ ^a	AACAGAATTCGGAAGGTAAATACCACC (EcoRI)
PARPD ₃ ^a	CGCGGATCCCTCCTCAGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
PARCSG ₂ ^a	TGCGTCGACCTCGGGGAAGGTAAATCCCAC (Sall)
CARCSG ₂ ^a	TGCGTCGACCTCGGAGAAGGTAAATACCAC (Sall)
MIKPD ₃ ^a	CGCGGATCCCTCTTCGGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
MIKCSG ₂ ^a	TGCGTCGACCTCGGTGAAGGCAAATATCAC (Sall)
KUDPD ₃ ^a	CGCGGATCCCTCTTCTGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
BAYCSG ₂ ^a	TGCGTCGACCTAGGTGAAGGTAAATACCATC (Sall)
BAYPD ₃ ^a	CGCGGATCCCTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
PASPD ₃ ^a	ATCCTGATCACTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BclII)
ADH1TERMF ^a	CCGGAATTCGAGCTCAAGCTTTGGACTTCTTCGCC (SacI)
ADH1TERMR ^a	ATCCGCGGACTAGTGGCCGGTAGAGGTGTGG (SpeI)
PXCER ₂₃ ^b	CAGCCATTGACATTTTC
PXCER ₃₉ ^b	CGATTAAGCAAACGCAAC
PXPAR ₃₉ ^b	CAACTAAGCAAACGCAAC
PXCAR ₃₉ ^b	CAACTAAGCAAACGCGAC
PXMIK ₄₀ ^b	GCTAGAAAGCAAATGTAAC
PXKUD ₃₉ ^b	CTAGTAACTAAACGTGAC
PXBAY ₃₉ ^b	GGGCGGGCAAACATACC
TLC1T7F ^c	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGGAAGATAGGTACC</u>
TLC1R ^c	AAATGTTTCCAAAAATTATCTAAATGC
RH97 ^d	GATGGAAACTCAAACG (helix I)
RH119 ^d	CCAAATTTCTGAGGCC (helix I)
RH133 ^d	CCATCGAGTGCCTACC (helix IIa)
RH224 ^d	CTGACACCAGCATACTC (helix IIb)
RH316 ^d	TTACGGTTTGCATTTTC (helix IIc)
RH336 ^d	TAGCAGTGTTTAAG (helix IId)
RH387 ^d	GAAGGAATAACAGGA (helix IId_1)

RH459 ^d	GTGTGTGGGTGTGGT (template)
RH557 ^d	CAGTGTCAGAAA (helix IVb)
RH589 ^d	TCTAACTTAACTCC (helix IVc)
RH603 ^d	TCTGTTTGCAAAT (helix IVc)
RH717 ^d	ACTAGAATA (helix V)
RH740 ^d	GGCAAAAATCTACTG (helix VI)
RH761 ^d	GTGGGATTTATTCT (helix VI)
RH765 ^d	TTGTAGTGGGATT (helix VI)
RH867 ^d	ACCTACTCGTA (helix I)
RH897 ^d	TGCTTAAGAAAGGACACC (helix I)
RH916 ^d	CGCAAACCTAACCG (helix VIIa)
RH951 ^d	CGTTCTTGATCTTGTGTC (helix VIIa)
RH980 ^d	AAAACCATCTTGAAAA (helix VIIb)
RH1009 ^d	TGATCATCAAAGTAGTTTTA (helix VIIb)
RH1059 ^d	CGGTTCTTCCGC (helix VIId)

^a PCR primer oligonucleotides. Underlined sequences are restriction sites which were added for subcloning. The corresponding restriction enzyme is indicated in parenthesis. ^b Primer extension oligonucleotides. ^c Oligonucleotides used for PCR product generation, which served as template for RNA transcription in vitro. T7 RNA polymerase promoter is underlined. Base in bold is the first nucleotide incorporated into RNA during transcription. ^d RNase H oligonucleotide probes. Numbers indicate the positions of the first base on TLC1 RNA according to the numbering system defined in Figures 1 and 3. The targeted structure is indicated in parenthesis. Oligonucleotides for RNase H probing were HPLC- or gel-purified.

REFERENCES for Supplemental Material:

1. Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350, 87-96.
2. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Preparation of yeast genomic DNA (CsCl method). In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 133-135.
3. Dionne, I., and Wellinger, R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 13902-13907.
4. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Yeast RNA isolation. In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 140-142.
5. Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
6. Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol.* 101, 192-201.
7. Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47, 621-669.
8. Pace, N.R., Smith, D.K., Olsen, G.J., and James, B.D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—a review. *Gene* 82, 65-75.
9. Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10-26.
10. Juan, V., and Wilson, C. (1999). RNA secondary structure prediction based on free energy and phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 935-947.
11. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911-940.
12. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.
13. Wuyts, J., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (2001). Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 5017-5028.
14. De Rijk, P., Caers, A., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (1998). Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res* 26, 183-186.

15. Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., and Greider, C.W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152.
16. Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G.R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154, 164-175.
17. Good, L., Elela, S.A., and Nazar, R.N. (1994). Tetrahymena ribozyme disrupts rRNA processing in yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 22169-22172.
18. Sogin, M.L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., and Engberg, J. (1986). Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major Tetrahymena groups. *Embo J.* 5, 3625-3630.
19. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
20. Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., and Roberts, I.N. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1931-1942.
21. Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, 451-454.